



TITLE:

# Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University, Volume.52, 2009( Japanese version )

AUTHOR(S):

---

CITATION:

Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University, Volume.52, 2009.  
Annual Report of the Institute for Virus Research, Kyoto University 2010, 52

ISSUE DATE:

2010-04-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/108496>

RIGHT:

## CHRONOLOGICAL TABLE

1956 April	Institute for Virus Research, Kyoto University, was founded with two departments (Pathology and Biophysics).
1956 April	Scientific Lectures for the Public were presented commemorating the opening of the Institute (the successive Memorial Lecture Series have been presented annually hereafter).
1957 April	Department of Biochemistry and Department of Serology and Immunology were established.
1958 April	Department of Prevention and Therapeutics was established.
1958 December	"Advances in Virology", Vol. 1 (in Japanese) was published as collection of the Memorial Lectures (the successive volumes were published annually hereafter until 1960).
1958 December	"Annual Report of the Institute for Virus Research", Vol. 1, was published (the successive volumes have been published annually hereafter).
1959 July	Virus Diagnosis Center was established.
1961 October	The 1st Symposium of the Institute for Virus Research was held under the auspices of the Institute with the nationwide participants. The proceedings of the Symposium were published as the first issue of the new series of "Advances in Virology" in Japanese (the successive Symposia have been held and their proceedings published annually hereafter).
1962 April	Department of Tumor Virus was established.
1962 October	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Medicine, and students of the School were first admitted to the Institute.
1962 December	Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Science, and students of the School were first admitted to the Institute.
1964 April	Virus Diagnosis Center was renamed Virological Diagnosis Center.
1965 September	Construction of the new building for the Institute commenced.
1967 March	Construction of the new building was completed.
1968 April	Department of Genetics was established.
1974 April	Department of Molecular and Cellular Virology was established.
1977 April	Department of Neurological Virus Disease was established as such that Visiting Staff be appointed.
1978 April	Animal Laboratory for Experimental Virus Infection was established.
1981 March	Construction of extension of the main building was completed. Thus the main building now constitutes five floors with a basement occupying the aggregate area of 5,410 m <sup>2</sup> . The major part (ca. 481 m <sup>2</sup> ) of the extended area serves for researches involving radioisotope labelling and in vitro DNA recombination experiments

requiring the P3 facilities.

- |               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1986 May      | The memorial events for the 30th anniversary of foundation of this Institute were held on May 16-17.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1986 November | Professor Yorio Hinuma was honoured as "Person of Cultural Merits (Bunkakorosha)"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 1987 May      | Department of Biophysics and Department of Tumor Virology were reorganized to form Department of Viral Oncology which consists of 4 Laboratories.                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 1988 April    | Virological Diagnosis Center was reorganized to become Research Center for Immunodeficiency Virus which consists of Laboratory for AIDS Immunology and Laboratory of Viral Pathogenesis.                                                                                                                                                                                                                                     |
| 1989 April    | Department of Biochemistry and Department of Genetics were reorganized to form Department of Genetics and Molecular Biology which consists of 3 Laboratories.                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1990 March    | Construction of a new building was partly completed.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1990 April    | Department of Pathology and Department of Molecular and Cellular Virology were reorganized to form Department of Cell Biology which consists of 3 Laboratories, while Department of Serology and Immunology, Department of Prevention and Therapeutics and Department of Neurological Virus Disease were reorganized to form Department of Biological Responses which consists of 2 laboratories and one for visiting staff. |
| 1992 April    | Laboratory of Regulatory Information was established within the Department of Cell Biology to host a visiting professor as well as a research group.                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1993 December | Construction of the new building which accommodates three laboratories from this Institute as well as some from the Medical School and the Center for Molecular Biology and Genetics of the University was completed.                                                                                                                                                                                                        |
| 1994 October  | Construction of a new animal facility with some laboratories was completed.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 1998 April    | One staff member was appointed academic staff of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and students of the school were first admitted to the Institute.                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 1998 April    | Research Center for Immunodeficiency Virus was reorganized to become Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 1998 April    | Laboratory of Virus Control in Research Center for Immunodeficiency Virus was established as such that Visiting Staff be appointed.                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 1999 April    | Several staff members were appointed academic staff of the Graduate School of Biostudies, and students of the school were first admitted to the Institute.                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 2002 April    | The Experimental Research Center for Infected Animals was abolished and the Experimental Research Center for Infectious Diseases was established instead.                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2005 April    | Research Center for Emerging Virus was established.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

## ORGANIZATION AND STAFF

(as of December, 2009)

(Numerals in parentheses indicate year of association with the Institute)

**Director** Ryoichiro Kageyama, M.D., D.Med.Sc.  
**Deputy Director** Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc.

**Professors Emeriti** Yoshimi Kawade, D.Sc. (1956-1988)  
Yorio Hinuma, M.D., D.Med.Sc. (1980-1988)  
Masao Hanaoka, M.D., D.Med.Sc. (1959-1989)  
Mutsuo Imai, D.Sc. (1965-1991)  
Takashi Yura, D.Sc. (1960-1993)  
Masakazu Hatanaka, M.D., D.Med.Sc. (1980-1995)  
Akinori Ishimoto, M.D., D.Med.Sc. (1964-1968, 1978-2002)  
Yoshiaki Ito, M.D., D.Med.Sc. (1984-2002)  
Masanori Hayami, D.V.M., D.Agr. (1988-2006)  
Koreaki Ito, D.Sc. (1971-2007)

### Department of Viral Oncology

#### Laboratory of Gene Analysis

Professor Yoshinori Akiyama, D.Sc. (1988)  
Associate Professor Hiroyuki Sakai, D.Med.Sc. (1996)  
Hiroyuki Mori, D.Sc. (1996)  
Assistant Professor Shin-ichi Yanagawa, D.Agr. (1986)  
Shinobu Chiba, D. Sc. (2009)

#### Laboratory of Cell Regulation

Professor Masahiko Sugita, M.D., D.Med.Sc. (2004)  
Associate Professor Isamu Matsunaga, M.D., D.Med.Sc. (2004)

#### Laboratory of Tumor Biogenesis

Professor Shin Yonehara, D.Sc. (1994) (concurrent)

#### Laboratory of Human Tumor Viruses

Associate Professor Makoto Hijikata, D.Med.Sc. (1997)

### Department of Genetics and Molecular Biology

#### Laboratory of Molecular Genetics

Professor Takashi Fujita, D.Sc. (2005)  
Associate Professor Mitsutoshi Yoneyama, D.Sc. (2006)  
Assistant Professor Kiyohiro Takahashi, D.Sc.(2009)

#### Laboratory of Biochemistry

Professor Mutsuhito Ohno, D.Sc. (2001)  
Assistant Professor Makoto Kitabatake, D.Sc.(2004)  
Ichiro Taniguchi, D.Sc. (2007)

#### Laboratory of Genetic Information Analysis

Associate Professor Haruo Ohmori, D.Sc. (1979)

### Department of Biological Responses

#### Laboratory of Biological Protection

Professor Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)  
Assistant Professor Masamichi Ueda, D.Sc. (1978)  
Shizue Tani-ichi, D.Health Sc. (2007)  
Takahiro Hara, D. Bio. (2008)

#### Laboratory of Infection and Prevention

Professor Junji Yodoi, M.D., D.Med.Sc. (1989)



Associate Professor	Hiroshi Masutani, M.D., D.Med.Sc. (1992)
Assistant Professor	Keiko Takemoto, D.Sc. (1992)
	Aoi Son, M.D., D.Med.Sc. (2006)
Bioresponse Regulation Laboratory	
Visiting Professor	Yousuke Takahama, D.Med.Sc. (2009)
Visiting Associate Professor	Hideyuki Tanabe, D.Sc. (2009)

### **Department of Cell Biology**

Laboratory of Subcellular Biogenesis	
Professor	Fumiko Toyoshima, D.Sc. (2008)
Assistant Professor	Shigeru Matsumura, D.Bio. (2008)
Laboratory of Growth Regulation	
Professor	Ryoichiro Kageyama, M.D., D.Med.Sc. (1997)
Associate Professor	Toshiyuki Ohtsuka, M.D., D.Med.Sc. (2000)
Assistant Professor	Taeko Kobayashi, D.Sc. (2005)
Laboratory of Signal Transduction	
Associate Professor	Takayuki Miyazawa, D.V.M., D. Vet.Med. (2005)
Assistant Professor	Akira Murakami, D.Sc. (1979)
Laboratory of Regulatory Information	
Visiting Professor	Susumu Tonegawa, Ph.D, D.Sc. (1992)

### **Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome**

Laboratory of Viral Pathogenesis	
Head • Professor	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2004)
Assistant Professor	Hirotsuka Ebina, D.Med.Sc. (2009)
Laboratory of Virus Control	
Professor	Masao Matsuoka, M.D., D.Med.Sc. (1999)
Assistant Professor	Yorifumi Satou, M.D., D.Med.Sc. (2008)
Laboratory of Viral Disease Mechanism	
Visiting Professor	Shinji Harada, M.D., D.Med.Sc. (2008)

### **Experimental Research Center for Infectious Diseases**

Laboratory of Mouse Model	
Professor	Yoichi Shinkai, D.Med.Sc. (1998)
Associate Professor	Makoto Tachibana, D.Agr. (1998)
Assistant Professor	Toshiaki Tsubota, D.Sc. (2009)
Laboratory of Primate Model	
Head • Professor	Tatsuhiko Igarashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2007)
Associate Professor	Tomoyuki Miura, D.V.M., D.Agr. (1988)
Assistant Professor	Takeshi Kobayashi, D.V.M., D.Med.Sc. (2008)

### **Center for Emerging Virus Research**

Head • Professor	Yoshio Koyanagi, M.D., D.Med.Sc. (2006)
Laboratory for Viral Replication	
Associate Professor	Eiji Ido, D.Sc. (2006)
Laboratory for Host Factors	
Associate Professor	Youichi Suzuki, D.Med.Sc. (2006)

### **Lecturers (part time)**

Hironori Niki  
 Hideki Nishitoh  
 Tetsuro Matano  
 Jun Nishihira  
 Masaaki Miyazawa  
 Hiroyuki Mano  
 Takeshi Imamura

Tomohiko Takasaki  
Ryuzo Torii  
Chieko Kai

### **Library**

Committee Chairman

Koichi Ikuta, M.D., D.Med.Sc. (2002)

### **Administration Office**

Chief Officer  
General Affairs  
Finance

Masahiro Nogi (2008)  
Tomoko Kimura (2009)  
Yoshifumu Yamasaki (2008)

### **Research Fellows**

Yohei Hizukuri  
Keiichiro Arimoto  
Kaku Gotoh  
Yoshiyuki Matsuo  
Rie Watanabe  
Aitor Gonzalez  
Hiromi Shimojo  
Tomoko Tateya  
Yasutaka Niwa  
Akihiro Isomura  
Itaru Imayoshi,  
Takahiko Matsuda  
Shigeki Hoshino  
Eiji Sato  
Fan Jun  
Kazuya Shimura

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control.)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Immunol.)

### **Graduate Students**

#### ***Graduate School of Science***

Akira Saito  
Hisashi Kiryu  
Atsumi Miyata  
Tatsuya Suzuki  
Asako Mc Closkey  
Reiko Takemura  
Megumi Hujita  
Kotarou Fujii  
Kazuhiro Akiishi  
Tomoko Sakata  
Toshihiko Takeiwa  
Hiroto Izumi

Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)  
Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Biochem.)

#### ***Graduate School of Medicine***

Bingfei Liang  
Zhe Chen  
So Masaki  
Tsunehisa Tsuru  
Mitsuhiro Matsunaga  
Tan Sloklay  
Naoki Watanabe  
Takayuki Shojima

Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)

Masaya Okada	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Yuuki Nakaya	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Yasuhiko Shinoda	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)
Kei Sato	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)
Tomoko Kobayashi	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)
Tadashi Watanabe	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)
Peter Gee	Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)
Keita Hagiya	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Takeshi Naito	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Tiejun Zhao	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Azusa Nakanishi	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Nanae Taguchi	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Kenji Sugata	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Guangyong Ma	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Aaron Coutts	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Takehisa Isobe	Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control)
Kenji Yanase	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Hiroyuki Ohotsuki	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

### ***Graduate School of Human and Environmental Studies***

Takuji Ohata	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Rokusuke Yoshikawa	Dept. Cell Biol. (Lab. Signal Transduction.)
Ryosuke Hyuga	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Kenta Matsuda	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Megumi Nakamura	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Mariko Horiike	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Yasuhisa Fujita	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)
Sakiko Nakasone	Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Primate Model)

### ***Graduate School of Biostudies***

Naoko Kajitani	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Ayano Satsuka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Tokuya Hattori	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Natsuko Tanaka	Dept. Viral Oncol. (Lab. Gene Analy.)
Daisuke Morita	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Tetsuo Urakawa	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Sachi Kobayashi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Takaya Komori	Dept. Viral Oncol. (Lab. Cell Regul.)
Yue Qi	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Yukihiro Kushima	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Yuichi Abe	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Chieko Tsutsui	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Makiko Shimizu	Dept. Viral Oncol. (Lab. Human Tumor Viruses)
Ryo Narita	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Seigyoku Go	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Maiko Kageyama	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Anna Wrabel	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Ryota Ouda	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Kei Sato	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Michihiko Jogi	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Shiori Takamatsu	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Chihiro Nisikawa	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Yoo Ji Seung	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Ayumi Takahashi	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)
Ng Chen Seng	Dept. Genet. Mol. Biol. (Lab. Molecular. Genetics)

Akifumi Abe  
Eiji Yoshihara  
Hideyuki Suwa  
Hiroharu Einaga  
Dorys Adriana Lopez  
Mayumi Hamasaki  
Keisuke Ikawa  
Masayuki Sakamoto  
Yukiko Harima  
Yoshinori Ando  
Seiji Yamamoto  
Takaaki Yokoyama  
Yasuteru Sakurai  
Yuichi Mitobe  
Toshiyuki Matsui  
Tae Komai  
Marie Murakami  
Shuzo Okuno  
Yang Chia-Ming  
Katsuaki Deguchi  
Daisuke Muramatsu  
Mayuko Inoue  
Yutaro Yamaguchi  
Yasutsugu Suzuki

Dept. Biol. Resp. (Lab. Biol. Protect.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Biol. Resp. (Lab. Inf. Prev.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellular Biogenesis.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Subcellular Biogenesis.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Dept. Cell Biol. (Lab. Growth Regul.)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Viral Pathogenesis)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control.)  
Res. Cen. AIDS (Lab. Virus Control.)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Exp. Res. Cen. Inf. Dis. (Lab. Mouse Model)  
Cent. Emerging Virus Res. (Lab. Host Factors)

## CONTENTS

### Research Activities

#### DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

#### LABORATORY OF GENE ANALYSIS

##### I. First Group

- 1) Structural basis for the SecDF enhancement of protein export: T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, H. MORI, Y. ECHIZEN<sup>1</sup>, R. ISHITANI<sup>1</sup>, S. FUKAI<sup>2</sup>, T. TANAKA<sup>3</sup>, K. MIO<sup>4</sup>, M. KAWADA<sup>4</sup>, T. MORI<sup>5</sup>, Y. SUGITA<sup>5</sup>, A. PEREDRERINA<sup>6</sup>, D. G. VASSYLYEV<sup>6</sup>, T. KOHNO<sup>3</sup>, C. SATO<sup>4</sup>, K. ITO<sup>7</sup> and O. NUREKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>2</sup>Life Science Division, Synchrotron Radiation Research Organization, University of Tokyo, <sup>3</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, <sup>4</sup>Neuroscience Research Institute and Biological Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <sup>5</sup>Advanced Science Institute, RIKEN, <sup>6</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama <sup>7</sup>Kyoto Sangyo University) ...3
- 2) YfgM identified as a SecG-interacting factor by site-directed *in vivo* photo-cross-linking: N. TANAKA, G. KOBAYASHI, N. DOHMAE<sup>1</sup>, T. SUZUKI<sup>1</sup>, K. ITO<sup>2</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Advanced Science Institute, RIKEN, <sup>2</sup>Kyoto Sangyo University) ...4
- 3) Role of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*, in regulation of its protease function: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA ...4
- 4) Involvement of RseP in proteolytic degradation of signal peptides cleaved from secretory proteins: A. SAITO, S. CHIBA, H. MORI and Y. AKIYAMA ...5
- 5) Identification and characterization of *E. coli* factors involved in membrane protein biogenesis and stress responses to its failure: T. HATTORI, H. MORI and Y. AKIYAMA ...5
- 6) Induction of extracytoplasmic stress responses by an abnormal membrane protein: Y. AKIYAMA ...6
- 7) Structural analysis of FtsH, a membrane-bound, ATP-dependent protease by X-ray crystallography: R. SUNO, Y. AKIYAMA, S. IWATA<sup>1</sup> and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Medicine, Kyoto University, <sup>2</sup>the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology) ...6
- 8) Visualizing cellular nascent polypeptides: K. ITO<sup>1</sup>, S. CHIBA and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Kyoto Sangyo University) ...7
- 9) Multiple translational arrest sites of MifM suggest the plasticity in the mechanism of regulated translational stalling: S. CHIBA, K. ITO<sup>1</sup> and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Kyoto Sangyo University) ...7

##### II. Second Group

- 1) Analysis of Molecular Mechanism Underlying Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway: S. YANAGAWA ...8
- 2) Mechanisms of the HPV-induced transformation: A. SATSUKA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA

	and H. SAKAI	...9
3)	A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines: A. SATSUKA, S. YOSHIDA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA and H. SAKAI	...9
4)	Molecular mechanism of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells: H. NAKAMURA, A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, K. SASAKI and H. SAKAI	...10
5)	Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4: N. KAJITANI, A. SATSUKA, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI and H. SAKAI	...10
	<b>LIST OF PUBLICATIONS</b>	...11

#### **LABORATORY OF CELL REGULATION**

1)	Reconstitution of the human CD1 system in mice: T. KOMORI, D. MORITA, C. KOBAYASHI, I. MATSUNAGA, T. SHIINA <sup>1</sup> and M. SUGITA ( <sup>1</sup> Tokai Univ.)	...14
2)	A novel form of DTH reactions to mycobacterial lipids: T. KOMORI, I. MATSUNAGA, H. HARASHIMA <sup>1</sup> and M. SUGITA ( <sup>1</sup> Hokkaido Univ.)	...14
3)	Lipid biology of dormant mycobacteria: T. URAKAWA, I. MATSUNAGA and M. SUGITA	...15
4)	Lipid immunity in AIDS: D. MORITA, M. HORIIKE <sup>1</sup> , T. MIURA <sup>1</sup> , T. IGARASHI <sup>1</sup> and M. SUGITA ( <sup>1</sup> Laboratory of Primate Model, IVR)	...15
	<b>LIST OF PUBLICATIONS</b>	...15

#### **LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS**

1)	Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase: M. KIRIYAMA, Y. KOBAYASHI, M. SAITO, F. ISHIKAWA and S. YONEHARA	...17
2)	FLASH is indispensable for early embryonic development but dispensable for proliferation of ES cells: Y. MINAMIDA and S. YONEHARA	...17
3)	An essential role of Wnt signals in the differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI	...18
	<b>LIST OF PUBLICATIONS</b>	...18

#### **LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

1)	Studies on the life cycle of blood-borne HCV using novel in vitro culture system: H. H. ALY, T. YAMAGUCHI, Y. QI, K. SHIMOTOHNO and M. HIJIKATA	...20
2)	Three dimensional culture of the immortalized human hepatocyte available of drug search and screening for blood-borne hepatitis C virus: H. H. ALY, K. SHIMOTOHNO and M. HIJIKATA	...20
	<b>LIST OF PUBLICATIONS</b>	...21

## **DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

### **LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS**

- 1) Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: T. SHIGEMOTO, M. KAGEYAMA, R. HIRAI, M. YONEYAMA and T. FUJITA ...23
- 2) Identification of the RNA recognition loop in C-terminal domains of RIG-I and LGP2: K. TAKAHASHI, H. KUMETA, N. TSUDUKI, M. YONEYAMA, R. HIRAI, R. NARITA, T. SHIGEMOTO, M. HORIUCHI, K. OGURA, T. FUJITA and F. INAGAKI ...23
- 3) RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease: S. SATO, K. HOSHINO, T. SATOH, T. FUJITA, Y. KAWAKAMI and M. KUWANA ...24

LIST OF PUBLICATIONS ...24

### **LABORATORY OF BIOCHEMISTRY**

- 1) RNA distribution in the cell: I. TANIGUCHI, H. KIRIU, T. SUZUKI, A. MCCLOSKEY, R. TAKEMURA, K. AKIISHI, T. TAKEIWA and H. IZUMI ...27
- 1-1) Identity elements used in mRNA export ...27
- 1-2) Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursors ...27
- 2) rRNA quality control mechanisms: M. KITABATAKE, A. MIYATA, K. FIJII and T. SAKATA ...27

LIST OF PUBLICATIONS ...28

### **LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS**

- 1) Overlapping in short motif sequences for binding to human REV7 and MAD2 proteins: T. HANAFUSA, T. HABU, J. TOMIDA, E. OHASHI, Y. MURAKUMO and H. OHMORI (<sup>1</sup>Radiation Biology Center, Kyoto University, <sup>2</sup>Kyushu University, <sup>3</sup>Nagoya University) ...31
- 2) Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases: H. OHMORI, T. HANAFUSA, E. OHASHI<sup>1</sup> and C. VAZIRI<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Kyushu University, <sup>2</sup>University of North Carolina, USA) ...31
- 3) Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. A. HISHIKI<sup>1</sup>, H. HASHIMOTO<sup>1</sup>, T. HANAFUSA, K. KAMEI, E. OHASHI, T. SHIMIZU<sup>1</sup>, H. OHMORI and M. SATO<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Yokohama City University) ...32
- 4) Interaction with DNA polymerase  $\eta$  is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells: J. AKAGI<sup>1</sup>, C. MASUTANI<sup>1</sup>, Y. KATAOKA<sup>1</sup>, T. KAN, E. OHASHI, T. MORI<sup>2</sup>, H. OHMORI and F. HANAOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup>Nara Medical University) ...32

LIST OF PUBLICATIONS ...33

## **DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES**

### **LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION**

- 1) Activation of the mouse TCR $\gamma$  enhancers by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA ...35
- 2) Accessibility control of TCR V $\gamma$  region by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA ...35
- 3) IL-7R controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells: S. TANIICHI, A. ABE and K. IKUTA ...36
- 4) Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid tissues: T. HARA, S. TANI-ICHI and K. IKUTA ...36
- 5) Local function of IL-7 produced by thymic and epidermal epithelial cells: T. HARA, B. LIANG, S.TANI-ICHI and K. IKUTA ...37
- 6) Detection of calreticulin in urine as a cancer marker: M. UEDA, S. KAGEYAMA<sup>1</sup> and T.YOSHIKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shiga University of Medical Science) ...37

LIST OF PUBLICATION ...38

### **LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION**

- 1) Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-Cyclin D1 pathway: M. MOCHIZUKI, Y.W. KWON, J. YODOI and H. MASUTANI ...39
- 2) Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF): regulatory role of TRX on MIF internalization and signaling: A. SON, N. KATO, T. HORIBE, Y. MATSUO, M. MOCHIZUKI, A. MITSUI, K. KAWAKAMI, H. NAKAMURA and J. YODOI ...39
- 3) Thioredoxin-binding protein-2 deficiency enhances methionine-choline deficient diet-induced hepatic steatosis but inhibits steatohepatitis in Mice: MK. AHSAN, H. OKUYAMA, Y. HOSHINO, S. OKA, H. MASUTANI, J. YODOI and H. NAKAMURA ...40
- 4) Thioredoxin binding protein 2 modulates natural killer T cell-dependent innate immunity in the liver: possible link to lipid metabolism: H. OKUYAMA, T. YOSHIDA, A. SON, S. OKA, D. WANG, R. NAKAYAMA, H. MASUTANI, H NAKAMURA, Y NABESHIMA and J, YODOI ...40
- 5) Physical and functional interaction of transmembrane thioredoxin-related protein with major histocompatibility complex class I heavy chain: redox-based protein quality control and its potential relevance to immune responses: Y. MATSUO, H. MASUTANI, A. SON, S. KIZAKA-KONDOH and J. YODOI ...41

LIST OF PUBLICATIONS ...41

## **DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**

### **LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS**

- 1) Genome-wide screening of the kinases required for the control of cell division axis: S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA<sup>1</sup>, T. YAMAMOTO<sup>2</sup>, E. NISHIDA<sup>3</sup> and F.



	TOYOSHIMA ( <sup>1</sup> ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, <sup>2</sup> iCeMS, Kyoto University, <sup>3</sup> Graduate School of Biostudies, Kyoto University)	...	45
2)	Roles of cholesterol in the progression of mitosis: M. HAMASAKI and F. TOYOSHIMA	...	45
3)	Regulation of the integrin traffic by mitotic regulators: K. IKAWA, S. MATSUMURA, <sup>1</sup> M. FUKUDA and F. TOYOSHIMA (1Department of Developmental Biology and Neurosciences, Tohoku University)	...	46
	LIST OF PUBLICATIONS	...	46

#### LABORATORY OF GROWTH REGULATION

1)	The cyclic gene <i>Hes1</i> contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells: T. KOBAYASHI, H. MIZUNO, I. IMAYOSHI, C. FURUSAWA, K. SHIRAHIGE and R. KAGEYAMA	...	47
2)	Hopf bifurcation in the presomitic mesoderm during the mouse segmentation: A. GONZALEZ and R. KAGEYAMA	...	48
3)	Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/ <i>Hes1</i> activity: D.S.WALL, A.J. MEARS, B. MCNEILL, C. MAZEROLLE, S. THURIG, Y. WANG, R. KAGEYAMA and V.A. WALLACE	...	48
4)	Notch- <i>Hes1</i> pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27Kip1: J. MURATA, T. OHTSUKA, A. TOKUNAGA, S. NISHIIKE, H. INOHARA, H. OKANO and R. KAGEYAMA	...	49
5)	The first <i>Hes1</i> dimer inhibitors from natural products: M.A. ARAI, A. MASADA, T. OHTSUKA, R.KAGEYAMA and M. ISHIBASHI	...	49
6)	Spatiotemporal pattern in somitogenesis: a non-turing scenario with wave propagation: H. NAGAHARA, Y. MA, Y. TAKENAKA, R. KAGEYAMA and K. YOSHIKAWA	...	50
	LIST OF PUBLICATIONS	...	50

#### LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

1)	Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for companion animals: R. YOSHIKAWA, M. OKADA, M. GOLDER <sup>1</sup> , H. STEWART <sup>1</sup> , M. PALMARINI <sup>1</sup> and T. MIYAZAWA ( <sup>1</sup> Institute for Comparative Medicine, University of Glasgow)	...	54
2)	Focus assay on FeLIX-dependent feline leukemia virus: Y. NAKAYA, T. SHOJIMA, S. HOSHINO and T. MIYAZAWA	...	54
3)	Epigenetical characterization of human porcine endogenous retrovirus receptor 2 in placenta: Y. NAKAYA and T. MIYAZAWA	...	54
	LIST OF PUBLICATIONS	...	55

## RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME

### LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS

- 1) Molecular analysis on interaction of HIV-1 and host factors: K. SATO, T. KOBAYASHI, Y. SHINODA, T. WATANABE, S. YAMAMOTO, P. GEE, N. MISAWA, H. EBINA and Y. KOYANAGI ...58
- 2) HIV pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA, T. KOBAYASHI and Y. KOYANAGI ...59
- 3) Mechanism of herpes virus neuropathogenesis: Y. ANDO, T. WATANABE., P. GEE and Y. KOYANAGI ...60

LIST OF PUBLICATIONS ...60

### LABORATORY OF VIRUS CONTROL

- 1) Analyses of *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* gene in the pathogenesis of HTLV-1: Y. SATOU, P. MIYAZATO, K. TAKAI, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, A. NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE and M. MATSUOKA ...63
- 2) Identification of cellular proteins interacting with HBZ and characterization of virological and pathological significance of the interaction: T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, G. MA, A. COUTTS, Y. SATOU and M. MATSUOKA ...63
- 3) Characterization of the promoter regions for *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* gene: M. YOSHIDA, Y. SATOU and M. MATSUOKA ...64
- 4) The role of DNA double strand break repair enzymes in retroviral infection: Y. SAKURAI and M. MATSUOKA ...64
- 5) Resistant profiles of next-generation of HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA ...65
- 6) Development of small inhibitors to HIV: K. SHIMUARA, T. NAITO, T. ISOBE and M. MATSUOKA ...65

LIST OF PUBLICATIONS ...65

## EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

### LABORATORY OF MOUSE MODEL

- 1) Role of G9a HMTase in embryo proper lineage on suppression of extraembryonic genes: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI ...69
- 2) Role of G9a HMTase for pre-implantation development in mice: M. TACHIBABA and Y. SHINKAI ...69
- 3) Expression of the mouse PR domain protein Prdm8 in the developing central nervous system: T. KOMAI and Y. SHINKAI ...70
- 4) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET: T. MATSUI and Y. SHINKAI ...71

## LIST OF PUBLICATIONS

...71

### LABORATORY OF PRIMATE MODEL

- 1) High frequencies of resting CD4<sup>+</sup> T cells containing integrated viral DNA are found in rhesus macaques during acute lentivirus infections: Y. NISHIMURA, R. SADJADPOUR, J. J. MATTAPALLIL, T. IGARASHI, W. LEE, A. BUCKLER-WHITE, M. ROEDERER, T.W. CHUN and M. A. MARTIN ...74
- 2) Initiation of antiretroviral therapy 48 hours after infection with simian immunodeficiency virus potently suppresses acute-phase viremia and blocks the massive loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells but fails to prevent disease: M. KUBO, Y. NISHIMURA, M. SHINGAI, W. LEE, J. BRENCHLEY, B. LAFONT, A. BUCKLER-WHITE, T. IGARASHI and M.A. MARTIN ...75
- 3) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy: T. SUZUKI, N. YAMAMOTO, M. NONAKA, Y. HASHIMOTO, G. MATSUDA, S. N. TAKESHIMA, M. MATSUYAMA, T. IGARASHI, T. MIURA, R. TANAKA, S. KATO and Y. AIDA ...76
- 4) Immune impairment thresholds in HIV infection: S. IWAMI, S. NAKAOKA, Y. TAKEUCHI, Y. MIURA and T. MIURA ...76
- 5) Identification of functional domains in reovirus replication proteins muNS and mu2: T. KOBAYASHI, L. S. OOMS, J. D. CHAPPELL AND and T. S. DEMODY ...76

## LIST OF PUBLICATIONS

...77

### CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH

#### LABOLATORY FOR VIRUS REPLICATION

- 1) Molecular epidemiology of HIV in Democratic Republic of Congo: E. IDO, S. KARHEMERE, S. AHUKA, M. OMOKOKO, M. IMANI, T. TADA, S. IWAMOTO, A. UMEHARA, N. DAULY, Z. KASHONGWE and J.J. MUYEMBE ...80
- 2) Exposure to SIVmd-2 in southern Cameroon: public health implications: N. NDEMBI, L. KAPTUE and E. IDO ...81
- 3) Oral administration of a mixture of PR, RT and INT inhibitors to rhesus macaques that were persistently infected with SHIV-pr: E. IDO, M. ISHIMATSU, T. TADA, S. IWAMOTO and A. UMEHARA ...81

## LIST OF PUBLICATIONS

...82

### LABORATORY FOR HOST FACTORS

- 1) Dysfunction of retroviral integration complex by cellular kinases: Y. SUZUKI, Y. SHINODA and Y. SUZUKI ...84
- 2) Role of a HECT-domain E3 ubiquitin ligase, Huw1 in HIV-1 infection: S.

YAMAMOTO and Y. SUZUKI	・・・84
3) Inhibitory effect of Rho GTPase Rac2 on HIV-1 replication*: T. WATANABE and Y. SUZUKI	・・・85

LIST OF PUBLICATIONS	・・・85
----------------------	-------

Reproductive Engineering Team	・・・87
LIST OF PUBLICATIONS	・・・88

Computer Network of Institute For Virus Research	・・・89
Staff Changes of the Institute	・・・90
The Scientific Lectures of the Institute for Virus Research	・・・91
Seminars of the Institute for Virus Research	・・・92

## ウイルス研究所 --- 2 0 0 9

がんウイルス研究部門・がん遺伝子研究分野	・・・99
がんウイルス研究部門・細胞制御研究分野	・・・103
がんウイルス研究部門・生体発がん機構研究分野	・・・105
がんウイルス研究部門・ヒトがんウイルス研究分野	・・・107
遺伝子動態調節研究部門・分子遺伝学研究分野	・・・108
遺伝子動態調節研究部門・情報高分子化学研究分野	・・・111
遺伝子動態調節研究部門・遺伝子情報解析研究分野	・・・114
生体応答学研究部門・生体防御研究分野	・・・116
生体応答学研究部門・感染防御研究分野	・・・119
細胞生物学研究部門・構造形成学研究分野	・・・121
細胞生物学研究部門・増殖制御学研究分野	・・・123
細胞生物学研究部門・信号伝達学研究分野	・・・126
エイズ研究施設・ウイルス病態研究領域	・・・128
エイズ研究施設・ウイルス制御研究領域	・・・131
感染症モデル研究センター・ゲノム改変マウス研究領域	・・・133
感染症モデル研究センター・霊長類モデル研究領域	・・・136
新興ウイルス感染症研究センター・複製基盤解析チーム	・・・139
新興ウイルス感染症研究センター・宿主要因解析チーム	・・・141
マウス作製支援チーム	・・・143
ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム	・・・144
構成員	・・・145

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**  
**LABORATORY OF GENE ANALYSIS**

**I. First Group**

The research projects carried out in this group are concerned with post-translational events in the expression of genetic information. Specifically, processes of protein translation, protein translocation across and integration into the membrane, membrane protein proteolysis and extracytoplasmic stress responses are investigated by combined molecular genetic, biochemical and structural approaches.

- 1) **Structural basis for the SecDF enhancement of protein export: T. TSUKAZAKI<sup>1</sup>, H. MORI, Y. ECHIZEN<sup>1</sup>, R. ISHITANI<sup>1</sup>, S. FUKAI<sup>2</sup>, T. TANAKA<sup>3</sup>, K. MIO<sup>4</sup>, M. KAWADA<sup>4</sup>, T. MORI<sup>5</sup>, Y. SUGITA<sup>5</sup>, A. PEREDRERINA<sup>6</sup>, D. G. VASSYLYEV<sup>6</sup>, T. KOHNO<sup>3</sup>, C. SATO<sup>4</sup>, K. ITO<sup>7</sup> and O. NUREKI<sup>1</sup>** (<sup>1</sup>Institute of Medical Science, University of Tokyo, <sup>2</sup>Life Science Division, Synchrotron Radiation Research Organization, University of Tokyo, <sup>3</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, <sup>4</sup>Neuroscience Research Institute and Biological Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <sup>5</sup>Advanced Science Institute, RIKEN, <sup>6</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama <sup>7</sup>Kyoto Sangyo University)

Transmembrane protein translocation in bacteria is driven by dynamic interplays between the protein-conducting SecYEG channel (translocon) and the SecA ATPase. In addition to the coupling with the ATP hydrolysis cycles of SecA, efficient export of protein emerging from the translocon requires the proton-motive force generated across the plasma membrane. A membrane-integrated Sec component, SecDF, associates with SecYEG and facilitates completion of protein export, but its structure and exact function have remained elusive. We have determined the 3.5 Å-resolution entire structure and higher resolution periplasmic domain structures of SecDF from *Thermus thermophilus*. It consists of a pseudo-symmetrical transmembrane domain and two protruding periplasmic domains with novel head-base architectures. The head subdomain of the first periplasmic domain assumes at least two different orientations relative to the base. Our X-ray, electron microscopic and *in silico* structures as well as biochemical analyses showed that the periplasmic domain indeed alternates between the two conformations. Crosslinking experiments demonstrated that such conformational transition of the periplasmic domain is crucial for the SecDF function. Moreover, the periplasmic domain has an ability to bind unfolded proteins with affinities depending on the conformational states. Intriguingly, the transmembrane helices of SecDF proved to be virtually identical with those of AcrB, an RND family multi drug-H<sup>+</sup> antiporter, in their geometrical arrangements. Functional importance has been shown for several charged residues at

the transmembrane SecD/SecF-interface, including an evolutionarily conserved aspartate, whose counterpart in AcrB is involved in the conduction of protons. We propose that SecDF functions as a dynamic membrane-integrated chaperone, possibly powered by the proton-motive force, to facilitate SecYEG-mediated protein translocation.

**2) YfgM identified as a SecG-interacting factor by site-directed *in vivo* photo-cross-linking: N. TANAKA, G. KOBAYASHI, N. DOHMAE<sup>1</sup>, T. SUZUKI<sup>1</sup>, K. ITO<sup>2</sup>, Y. AKIYAMA and H. MORI. (<sup>1</sup>Advanced Science Institute, RIKEN, <sup>2</sup>Kyoto Sangyo University)**

In bacteria, SecA ATPase and SecYEG translocon play central roles in protein export across the cytoplasmic membrane. We addressed how Sec factors interact in living cells by site-directed *in vivo* photo-cross-linking experiments. Our systematic examinations revealed that SecG approaches SecA and SecY alternately during ATP hydrolysis cycles of SecA. We also found a new protein that was cross-linked with SecG (see last year's report). By means of metal chelating affinity chromatography and LC/MS analysis, we identified it to be YfgM, a single spanning cytoplasmic membrane protein of previously unknown function. Photo-cross-linking analysis using a  $\Delta yfgM$  strain substantiated this conclusion. Results of protease accessibility tests suggest that YfgM contains a large C-terminal domain that is exposed to the periplasm. Interestingly, the gene *yfgM* is a member of the *hisS* operon and located upstream of *yfgL* (*bamB*), encoding a component of the Bam ( $\beta$ -barrels assembly machinery) complex involved in biogenesis of outer membrane proteins (OMPs). These findings raise a possibility that YfgM participates in the OMP biogenesis pathway. For instance, it could facilitate transfer of OMP polypeptides from translocon to periplasmic chaperones for their efficient targeting to the outer membrane. This notion is consistent with our finding that the  $\Delta yfgM$  strain exhibits significantly up-regulated extracytoplasmic stress responses (ESR) (see below). Now we are examining this tempting possibility.

**3) Roles of the two PDZ domains of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*, in regulation of its protease function: Y. HIZUKURI and Y. AKIYAMA**

*E. coli* cells sense cell surface stresses, such as accumulation of misfolded proteins, and accordingly activate transcription of genes involved in the maintenance of the envelope integrity. Such cellular response is called “extracytoplasmic stress responses (ESR)”. The  $\sigma^E$  pathway of ESR is activated through sequential proteolytic cleavages of a membrane-bound anti- $\sigma^E$  protein, RseA, by membrane-integrated proteases DegS and RseP, which liberate  $\sigma^E$  dedicated for transcription of a class of stress-responsive genes. RseP has tandem, circularly permuted PDZ domains (PDZ-N and PDZ-C) in its periplasmic region. Our recent *in vivo* and *in vitro* studies

showed that several mutations in the putative ligand-binding pocket of PDZ-N make RseP capable of cleaving full-length RseA independently of the first cleavage by DegS, suggesting that the PDZ-N domain plays an important role in regulation of the two-step proteolysis of RseA through binding of some ligand (1). Recently, others reported another role of the RseP PDZ domains, in which cleavage of RseA by RseP is facilitated through direct recognition by PDZ-C of the newly exposed C-terminal residue of the DegS-cleaved RseA (2). However, this model was solely based on *in vitro* experiments using solubilized proteins and we have some contradicting evidence. We are thus attempting to identify physiological ligands of the RseP PDZ domains and elucidate roles of these domains in regulation of the proteolytic functions of RseP

(1) Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K. -i., Akiyama, S., and Akiyama, Y. (2008) J. Biol. Chem., 283, 35042-35052.

(2) Li, X., Wang, B., Feng, L., Kang, H., Qi, Y., Wang, J., and Shi, Y. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106, 14837-14842.

#### **4) Involvement of RseP in proteolytic degradation of signal peptides cleaved from secretory proteins: A. SAITO, S. CHIBA, H. MORI and Y. AKIYAMA**

Signal peptides (SPs) are essential for targeting of pre-secretory proteins to the cytoplasmic membrane (in prokaryotic cells) or the endoplasmic reticulum membrane (in eukaryotic cells). In eukaryotic cells, SPs are cleaved off by signal peptidase upon membrane translocation and then receive further degradation by signal peptide peptidase (SPP), an intramembrane cleaving protease (I-CLiP). On the other hand, prokaryotic cells have no SPP homolog and little is known about the metabolic fates of bacterial SPs. *E. coli* RseP is an S2P family I-CLiP and is involved in regulation of the  $\sigma^E$  pathway of extracytoplasmic stress response through regulated cleavage of membrane-bound anti- $\sigma^E$  protein, RseA. We have found that a model protein having a sequence derived from SP of  $\beta$ -lactamase (Bla) receives RseP-dependent cleavage *in vivo* (1). Our *in vivo* and *in vitro* studies show that RseP directly cleaves Bla-SP within its central hydrophobic region. We examined further whether RseP has general ability to cleave SPs and found that SPs from other 12 secretory proteins of *E. coli* indeed received *in vivo* cleavage in RseP-dependent manners. Our results suggest that RseP is the enzyme responsible for the degradation of SPs in *E. coli*.

(1) Akiyama, Y., Kanehara, K., and Ito, K. (2004) *EMBO J.* 23, 434-4442

#### **5) Identification and characterization of *E. coli* factors involved in membrane protein biogenesis and stress responses to its failure: T. HATTORI, H. MORI and Y. AKIYAMA**

While it is believed that extracytoplasmic stress response (ESR) in *E. coli* is induced in response to protein abnormalities in the periplasm and the outer membrane, we have shown that accumulation of abnormal cytoplasmic membrane proteins also activates ESR, indicating that *E.*

*coli* senses and responds to 'membrane stresses'. To gain insights into the mechanism of the membrane stress responses, we isolated multi-copy suppressors against the *secY351* mutation that specifically impairs folding/assembly processes of cytoplasmic membrane proteins and consequently activates ESR. Screening of the ASKA *E. coli* gene library yielded 26 candidate plasmids that restored the temperature-sensitive growth of the *secY351* mutant cells.

Further analysis showed that some of them lowered the expressions of ESR reporter genes and promoted membrane assembly of a model cytoplasmic membrane protein (SecY-PhoA3-3). These multi-copy suppressors could provide a useful clue to our understanding of the SecY function in membrane protein assembly as well as of the cellular mechanism of membrane stress recognition and response.

## **6) Induction of "extracytoplasmic" stress responses by an abnormal membrane protein: Y. AKIYAMA**

It is known that DegS is activated by interaction with a conserved C-terminal tri-peptide of outer membrane proteins (Omps), which triggers the proteolytic cascade to degrade RseA and to elicit the  $\sigma^E$  pathway extracytoplasmic stress response. In addition to abnormality of Omps, that of several periplasmic and cytoplasmic membrane proteins that lack the Omp-specific, DegS-activating peptide are known to induce the  $\sigma^E$ -controlled gene expression. However, mechanism of the latter modes of induction is unknown. We found that expression of a truncated form of a multispanning cytoplasmic membrane protein (YhbX\*) can activate  $\sigma^E$  in a DegS-independent manner. YhbX\* also activated the Cpx pathway of the extracytoplasmic stress response. The YhbX\*-provoked activation of  $\sigma^E$  requires RseP, the intact Cpx signal transduction system and DegP, a Cpx-regulated periplasmic protease. It is further promoted by Skp, a periplasmic chaperone. From our results we suggest the following scheme: (i) YhbX\* activates the Cpx pathway; (ii) which upregulates DegP; (iii) DegP and Skp somehow cooperate to introduce an initial cleavage into RseA; (iv) RseP introduces the second cleavage into RseA, leading to the  $\sigma^E$  activation. YhbX\* also receives degradation by DegP. Our findings revealed a DegS-independent mechanism of  $\sigma^E$  activation, in which the Cpx and the  $\sigma^E$  pathways crosstalk with each other and DegP/Skp is involved in the key regulatory proteolysis.

## **7) Structural analysis of FtsH, a membrane-bound, ATP-dependent protease by X-ray crystallography: R. SUNO, Y. AKIYAMA, S. IWATA<sup>1</sup> and M. YOSHIDA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Medicine, Kyoto University, <sup>2</sup>the Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology)**

ATP-dependent proteases are involved in various cellular processes including cell division,



cell differentiation, signal transduction, and stress response in bacteria. Among them, FtsH is unique in that it is membrane-embedded and growth-essential. FtsH degrades not only misassembled subunits of membrane protein complexes for their quality control but also some short-lived cytosolic regulatory proteins. FtsH comprises an N-terminal transmembrane segment and a C-terminal cytosolic region, which includes an AAA<sup>+</sup> (ATPases associated with diverse cellular activities) and a protease domain. Previously, we crystallized and determined the structure of an ADP-bound form of the soluble region of *T. thermophilus* FtsH (sFtsH) at 3.9 Å resolution. The FtsH soluble region has a hexameric structure, in which a substrate polypeptide could reach the protease catalytic sites through a tunnel leading from the AAA<sup>+</sup> domain of the adjacent subunit, but not from the central axial region. Recently, we succeeded in crystallizing sFtsH with several different ATP analogues. Diffraction data of up to 3.5 Å resolution have been collected with the beamline BL41 XU of Spring-8 at 100 K. Now, we are analyzing these data to determine new crystal structures of sFtsH with bound ATP analogues, which will give important insights into the molecular coordination of the FtsH-mediated substrate translocation and proteolysis with the ATPase cycles.

**8) Visualizing cellular nascent polypeptides: K. ITO<sup>1</sup>, S. CHIBA and Y. AKIYAMA**  
(<sup>1</sup>Kyoto Sangyo University)

Increasing evidence indicates that some proteins, such as SecM of *E. coli* (1) and MifM of *B. subtilis* (2), function while they are still in the ribosome-associated nascent state. They contain a conditional ribosome stalling sequence (3), which acts as a brake upon translation. More generally, elongation speed of protein synthesis might be fine-tuned, contributing to certain co-translational event such as subcellular targeting, folding and assembly. We envisage that it is important to extend the static proteomic information currently being collected in many organisms into more dynamic one, with sufficient temporal resolution to assess the event of nascent chain completion in relation to its folding or targeting. To this end, we are developing an experimental system to visualize cellular nascent polypeptides. Pulse-labeled *E. coli* proteins were first separated by SDS-PAGE under conditions that preserved peptidyl-tRNA molecules and then subjected to hydrolysis of the peptide-adenine ester linkage, followed by the second dimension electrophoresis. Thus, we were able to observe two lines of labeled materials representing completed full-length proteins and nascent polypeptides, the latter representing a dynamic "nascentome" of this organism. This system will enable us to investigate *in vivo* events of completion of specific as well as total proteins and genetic and physiological conditions affecting them.

(1) Nakatogawa, H. and Ito, K. (2002) Cell 108, 629-636.

(2) Chiba, S., Lamsa, A., and Pogliano, K. (2009) EMBO J. 28, 3461-3475.

(3) Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K. (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun., in press

**9) Multiple translational arrest sites of MifM suggest the plasticity in the mechanism of regulated translational stalling: S. CHIBA, K. ITO<sup>1</sup> and Y. AKIYAMA (<sup>1</sup>Kyoto Sangyo University)**

Recent discoveries of *Escherichia coli* SecM (secretion monitor) and *Bacillus subtilis* MifM (membrane protein insertion/folding monitor) disclosed that living cells have evolved nascent polypeptide chains as monitors of protein translocation/insertion machineries (1, 2). These nascent chain sensors undergo translational arrest, which is mediated by interaction between a specific C-terminal sequence motif of the nascent chain and the polypeptide exit tunnel of the ribosome, and is released when the N-terminal secretion (for SecM) or membrane integration (for MifM) determinant "senses" respective machinery and engages in the translocation/insertion reaction. The translational arrest places the ribosome at a specific site on mRNA such that it prevents secondary structure formation of the mRNA, thereby allowing translation initiation of the target gene downstream of either *secM* or *mifM*. Although translational arrest of SecM/MifM is accomplished in principle by interactions between the nascent chain and the ribosome, previous studies suggest that the PTC-proximal interaction plays essential role for the arrest by SecM. In contrast, MifM seems to depend strongly on the PTC-distal interaction within the exit tunnel. We performed cysteine scanning and chemical modification experiments to precisely determine the translational arrest point of MifM. Our results revealed that translational arrest of MifM generates at least two polypeptidyl-tRNA species, MifM<sup>1-88</sup>-tRNA and MifM<sup>1-89</sup>-tRNA, in contrast to other previously reported nascent chain-mediated translational arrests, which normally generate a homogeneous translational arrest product (3). This unique feature of MifM-mediated translational arrest may be attributed to a flexibility of the MifM nascent chain near the PTC, consistent with the idea that the PTC-distal interaction is crucially important for the translational arrest of MifM. Our current data provide further evidence for the existence of divergent mechanisms to achieve nascent chain-mediated translational arrest (3).

(1) Nakatogawa, H. and Ito, K. (2002) Cell 108, 629-636.

(2) Chiba, S., Lamsa, A., and Pogliano, K. (2009) EMBO J. 28, 3461-3475.

(3) Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K. (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun., in press

## **II. Second Group**

**1) Analysis of Molecular Mechanism Underlying Keratin-Associated Protein 13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway: S. YANAGAWA**

Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) is a component of cell-surface receptors for Wnt proteins and Wnt is known to promote recruitment of Axin by LRP6 thereby inhibiting  $\beta$ -catenin's degradation. I found that Keratin associated protein (Krtap) 13, a

cysteine-rich cytoplasmic protein which contains six tandem repeats of 10 amino acids with the CQ motif, binds to LRP6. Surprisingly, TCF-dependent-reporter assays in both HEK293T cells and *Drosophila* S2R<sup>+</sup> cells revealed that Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt/Wingless signaling. Because Krtap13 never induced production of any Wnt proteins, it is likely that Krtap13 activates Wnt signaling by mimicking some aspects of normal Wnt signal transduction. Krtap13-mediated activation of reporter activities were counteracted by Axin, suggesting that Krtap13 functions upstream of  $\beta$ -catenin. Actually, Krtap13 overexpression induced accumulation of  $\beta$ -catenin.

In addition, I found that Krtap13 binds to both LRP6 and Dvl, another Wnt signaling effector and that Dvl is required for Krtap13-mediated activation of Wnt signaling. In line with these, overexpression of Krtap13 promoted Dvl-aggregates formation. On the other hand, Wnt treatment is known to induce plasma membrane-associated LRP6 aggregates (LRP6 signalosomes), which contain Dvl and Axin (Science 316, 1619-1622, 2007). Thus, a possible molecular mechanism underlying Krtap13-induced activation of Wnt signaling is to joint LRP6 and Dvls under the plasma-membrane and to induce co-clustering of these two molecules, thereby mimic function of LRP6 signalosomes.

To analyze ectopic expression of Krtap13 in vivo, a project of production of transgenic mice expressing Krtap13 is now in progress.

## **2) Mechanisms of the HPV-induced transformation: A. SATSUKA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA and H. SAKAI**

In many reports on cancer research, the importance of the contact between the cancer stem cells and the microenvironments has been indicated. However, such study was not carried out with the cervical cancer. In the previous studies, it was suggested that HPV E6, E7, c-Myc, and H-ras were the key factors for the induction of the cancer stem cell in the cervical cancer. These factors might alter the microenvironment to be favorable for cancer development.

We are investigating the interaction between the epithelial cells and the dermal cells in the HPV-positive cancer. To examine the effect of the cancer cells in fostering the cancer-associated fibroblasts (CAFs), HPV-positive cancer cells, SiHa, HeLa, and Caski, were applied to the organotypic raft culture, and the effects on the fibroblasts were analyzed by gene-expression profiling. CD44 and  $\alpha$ -SMA might be used as the markers for the CAF induction. The effect of TGF $\beta$  produced by CAFs on the EMT of normal and HPV-positive keratinocytes was also examined. These inter-cellular communications might be important for the progression of the cervical cancer.

## **3) A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the**

**anti-viral effects of cytokines: A. SATSUKA, S. YOSHIDA, N. KAJITANI, H. NAKAMURA and H. SAKAI**

Human papillomaviruses (HPVs) infect to the stratified epithelial organ. The infection induces benign tumors, which occasionally progress into malignant tumors. To elucidate the virus-induced tumorigenesis, an understanding of HPV life cycle is crucial. In this report, we developed a new system for the analysis of the HPV lifecycle. The new system consists of a novel HPV replicon and an organotypic “raft” culture, by which the HPV DNA is maintained stably in normal human keratinocytes for a long period and the viral vegetative replication is reproduced. It will promote the biochemical and genetic studies on the HPV lifecycle and the tumorigenesis. This system is also valuable in screening for the anti-viral compounds. We confirmed the usefulness by evaluating the anti-virus effect of cytokines.

**4) Molecular mechanism of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells: H. NAKAMURA, A. SATSUKA, N. KAJITANI, S. YOSHIDA, K. SASAKI and H. SAKAI**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection causes rapid CD4-positive T cells depletion that is one of the hallmarks of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Although infection of HIV-1 directly causes the cell death, bystander apoptotic cell death is induced, resulting the massive loss of CD4-positive T cells in infected individuals. Thus, studying the biological mechanisms of bystander effect of infected cells is essential to understand AIDS pathogenesis. In order to investigate the molecular basis of bystander cell death induced by HIV-1 infected cells, we are intending to infect NL43 mutants containing single or combined deletions of Nef, Vif, Vpr, and Vpu, to CD4-positive T cells, and analyze whether or not these viral factors are involved in depletion of CD4-positive T cells.

**5) Identification of Novel Function of Human Papillomavirus E4: N. KAJITANI, A. SATSUKA, S. YOSHIDA, H. NAKAMURA, K. SASAKI and H. SAKAI**

HPV infection begins in the basal cells of the epithelium, and as these cells divide, differentiate, and migrate toward the surface of the epithelium, the virus is able to complete its life cycle. The viral life cycle depends on the differentiation of the epithelium, but how the life cycle is controlled is not well understood. It is interesting that viral oncoproteins cause the increase of cellular proliferation and/or transformation, but terminally cellular differentiation of epithelium is required for the viral life cycle is completed.

The expression of E4 occurs in the upper layers of the epithelium, coordinating with the onset of viral genome amplification and the expression of viral late genes. It is known that E4 disrupts the keratin networks. It is also known that E4 induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. But it is not known well about the details of E4. To investigate novel functions of E4, we performed yeast two-hybrid assays and got several candidate proteins as which interacts with E4. We carry on the analysis about the interactions between the each candidates and E4 in vitro or in vivo. In the future, we will ascertain the function of E4 and its involvement in viral life cycle.

## LIST OF PUBLICATIONS

### DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY

### LABORATORY OF GENE ANALYSIS

#### I. First Group

- Akiyama, Y. Quality control of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. J. Biochem. 46, 449-54, 2009.
- Chiba, S., Lamsa, A. and Pogliano, K. A ribosome-nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. EMBO J. 28, 3461-3475, 2009
- Hizukuri, Y., Morton, J. F., Yakushi, T., Kojima, S. and Homma, M. The peptidoglycan-binding (PGB) domain of the *Escherichia coli* Pal protein can also function as the PGB domain in *E. coli* flagellar motor protein MotB. J. Biochem. 146, 219-229, 2009.
- Inaba, K., Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H. Kinjo, M., Ito, K. and Suzuki, M. Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. EMBO J. 28, 779-791, 2009
- Ito, K. and Mori, H. The Sec protein secretion system. pp. 3-22, in Bacterial Secreted Proteins, Ed. K. Wooldridge, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009
- Ito, K. Editing disulphide bonds: error correction using redox currencies. Mol Microbiol. 75, 1-5, 2009
- 森 博幸、塚崎智也 立体構造解析からみえてきた SecA による蛋白質膜透過の分子メカニズム. 蛋白質核酸酵素 第 54 巻 pp685-695 2009.
- 塚崎智也、森 博幸 細菌型 Sec トランスロコンの構造から明らかになったタンパク質膜透過装置の構造変化. 生物物理 第 49 巻 pp288-289 2009.

---

Hizukuri, Y., Morton, J. F., Yakushi, T., Kojima, S. and Homma, M. : Analysis of the peptidoglycan-binding domain of the flagellar stator protein MotB using systematic mutagenesis and chimeric protein in *Escherichia coli*. BLAST X MEETING、Cuernavaca、Mexico、2009年1月18日—23日

檜作洋平、John Frederick Morton、薬師寿治、川岸郁朗、小嶋誠司、本間道夫：べん毛モーターの固定子と軸受けは相互作用しているか？ 第 15 回べん毛研究交流会、仙台、2009 年 3 月 9 日—11 日

Chiba, S., Ito, K., Akiyama, Y. and Pogliano, K. : A nascent chain that monitors membrane protein insertion in *Bacillus subtilis*. The 7th International Student Seminar、京都、2009 年 3 月 12 日

千葉志信：翻訳困難な遺伝情報を利用した遺伝子発現制御機構. 2008 年度遺伝学研究所研究会「単細胞における複合システム系の連帯と統合」、三島、2009 年 3 月 23 日—24 日

北村朗、寿野良二、秋山芳展、吉田賢右、金城政孝：「原核生物における蛍光相関分光法測定-原核細胞内タンパク質品質管理機構の解明に向けて」 蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達（6）、独立行政法人理化学研究所 仁科ホール、2009 年 3 月 27 日

檜作洋平、John Frederick Morton、薬師寿治、小嶋誠司、本間道夫：外膜リポタンパク質 Pal のペプチドグリカン結合 (PGB) ドメインは大腸菌べん毛モータータンパク質 MotB の PGB ドメインとしても機能する. 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、名古屋、2009 年 5 月 23 日

檜作洋平、小嶋誠司、本間道夫：完全な状態での大腸菌べん毛モーターの単離を視野に入れた固定子と軸受け間のジスルフィド架橋. 第 6 回 21 世紀大腸菌研究会、熱海、2009 年 6 月 11 日—12 日

田中夏子、小林元、堂前直、鈴木健裕、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸：部位特異的 *in vivo* 光架橋実験法を用いた SecE 近接因子の同定. 第 6 回 21 世紀大腸菌研究会、静岡、2009 年 6 月 11 日—12 日

千葉志信、伊藤維昭、秋山芳展、Kit Pogliano：枯草菌において蛋白質膜組込のセンサーとして働く翻訳途上鎖. 2009 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、神戸、2009 年 9 月 4 日—5 日

Hizukuri, Y., Kojima, S. and Homma, M.: Attempt to purify a whole-set of the bacterial flagellar motor with the disulfide-cross-linked stator. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10, 2009

Tsukazaki T., Mori H., Echizen, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O.: Structural analysis of bacterial Sec translocation machinery. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10, 2009

Mori H., Tsukazaki T., Echizen, Y., Ishitani, R., Nureki, O. and Ito, K.: Functional dissection of bacterial Sec translocation machinery. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10,

2009

- Tamura, T., Ito, K. and Inagaki K. A novel active-site sequence Cys-Asp-Ile-Cys altered *E. coli* DsbA into potent protein disulfide isomerase. The effect of combinatorial mutation of the active-site dipeptide of *E. coli* DsbA. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. October, 6-9. Sapporo, 2009
- 檜作洋平、小嶋誠司、本間道夫：細菌べん毛モーターの再構成に向けた固定子と軸受け間のジスルフィド架橋。第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日—24日
- Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K.-i., Akiyama, S., Ito, K. and Akiyama, Y.: A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日-24日
- 森博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭：バクテリアのタンパク質膜透過装置の構造と機能。第82回日本生化学会大会 シンポジウム「タンパク質膜透過装置の構造とダイナミックな機能」、神戸、2009年10月21日—24日
- 寿野良二、下立夏香、下山真和、秋山芳展、吉田賢右：「膜結合型 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の基質分解モデルの生化学的検討」、第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日—24日
- 森博幸、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭：Molecular mechanisms of SecA mediated protein translocation. 第47回日本生物物理学会年会 シンポジウム「タンパク質の膜透過輸送の最前線」、徳島、2009年10月30日—11月1日
- 伊藤維昭、森博幸、塚崎智也、濡木理：Sec 膜透過装置の構造、機能および制御 九州大学 P&P 合同公開シンポジウム「生命活動を制御する高次複合体の構造と機能」2009年12月22日—23日、福岡

## II. Second Group

---

- 柳川伸一：Molecular mechanisms underlying Keratin-associated-protein 13 induced activation of canonical Wnt signaling pathway. 第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月1—3日
- 佐塚文乃、梶谷直子、中村博保、酒井博幸：Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第68回日本癌学会学術総会、横浜、2009年10月1—3日
- 佐塚文乃、梶谷直子、中村博保、吉田智志、酒井博幸：HPV16における各種調節遺伝子のウイルスゲノムメンテナンスへの影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年10月25—27日
- 佐塚文乃、梶谷直子、中村博保、酒井博幸：A novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. The 9th Awaji International

Forum on Infection and Immunity. 兵庫, 2009年9月8—11日



**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**  
**LABORATORY OF CELL REGULATION**

The universe of antigens recognized by T lymphocytes has recently been expanded to include not only protein antigens but also lipid antigens. Unlike conventional MHC molecules that present protein-derived peptide antigens, molecules of the human group 1 CD1 family (CD1a, CD1b, CD1c) mediate presentation of lipid antigens to specific T lymphocytes. By taking lipid chemical and immunological approaches and by developing appropriate animal models (human CD1 transgenic mice, guinea pigs, and non-human primates), we aim at determining how CD1 has been evolved to function critically in host defense against microbial infection and cancer. Further, inappropriate immune responses to lipids may result in induction of allergy and autoimmune diseases. These critical aspects of the newly recognized lipid-specific immunity have now been addressed in our laboratory.

**1) Reconstitution of the human CD1 system in mice: T. KOMORI, D. MORITA, C. KOBAYASHI, I. MATSUNAGA, T. SHIINA<sup>1</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Tokai Univ.)**

Mice and rats are useful animals for many immunological studies, but important exceptions exist. These animals have deleted genes for group 1 CD1 family, and thus, lack the lipid recognition system that is comparable to that in humans. Given the necessity of appropriate small animal models for monitoring CD1-mediated immune responses *in vivo*, we attempted to develop two distinct, but complementary, animal systems; namely, guinea pigs and CD1 transgenic mice. We have recently found that guinea pigs have evolved the CD1 system equivalent to that in humans, capable of mounting the CD1-restricted T cell response to mycobacterial lipids. On the other hand, the paucity of critical reagents often hampers detailed analysis of CD1-mediated immune responses in guinea pigs. As an alternative animal model, we established CD1 transgenic mice in which group 1 CD1-dependent immunity was reconstituted. We generated CD1a transgenic mice carrying the human *CD1A* genome. The expression of CD1a molecules in these mice was detected exclusively in epidermal Langerhans cells and immature thymocytes, thus precisely representing CD1a distribution in humans. These mice have been used extensively for elucidation of many critical aspects of CD1a biology.

**2) A novel form of DTH reactions to mycobacterial lipids: T. KOMORI, I. MATSUNAGA, H. HARASHIMA<sup>1</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Hokkaido Univ.)**

In guinea pig models of infection with bacillus Calmette-Guerin (BCG), an attenuated vaccine strain of *Mycobacterium bovis*, we obtained evidence for the delayed-type hypersensitivity

(DTH) directed against lipid antigens. Pathogenic mycobacteria produce glucose monomycolate (GMM), a glucosylated species of mycolic acids, by utilizing host-derived glucose as a substrate for mycolyltransferases. The host CD1-based immunity detects these compounds and mount potent Th1-type T cell responses. Given that Th1 cytokines, such as interferon- $\gamma$ , are critical for host defense against mycobacterial infection, GMM is now considered as a good candidate of lipid-based vaccines against tuberculosis and related diseases.

**3) Lipid biology of dormant mycobacteria: T. URAKAWA, I. MATSUNAGA, M. SUGITA**

Control of latent tuberculosis, or infection with dormant mycobacteria, is one of the most critical challenges for global health. Having established an experimental model of dormant mycobacteria, we now detect lipid biosynthesis that occurs preferentially in dormant mycobacteria. Candidate genes for enzymes that mediate production of these lipid components, and BCG bacteria that overexpress the candidate genes have been cloned, hoping to serve as a valuable model strain of dormant mycobacteria. CD1-restricted T cell responses to these latent infection-specific lipid components have now been evaluated extensively in animal models.

**4) Lipid immunity in AIDS: D. MORITA, M. HORIIKE<sup>1</sup>, T. MIURA<sup>1</sup>, T. IGARASHI<sup>1</sup> and M. SUGITA (<sup>1</sup>Laboratory of Primate Model, IVR)**

By taking advantage of IVR's superb research environments and close collaboration with Prof. Igarashi's laboratory, this newly launched project addresses how CD1-dependent immunity functions in host defense against retrovirus infection. We have finished delineating the CD1 system in monkeys, highlighting not only expected similarities but also unexpected differences between humans and monkeys. We have now set out to analyze CD1-dependent immunity in SIV-infected monkeys and have identified an array of virus-derived lipidic molecules that the host immunity is able to recognize specifically.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**

**LABORATORY OF CELL REGULATION**

Nakao H, Matsunaga I, Morita D, Aboshi T, Harada T, Nakagawa Y, Mori N, Sugita M.  
Mycolyltransferase from *Mycobacterium leprae* excludes mycolate-containing glycolipid substrates. *J. Biochem.* 146: 659-665, 2009.

Matsunaga I, Moody DB. Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor. *J. Exp.*

Med. 206: 2665-2668, 2009.

杉田昌彦：ことばのカルテ CD1a Medical Tribune 42: 46, 2009.

---

Sugita M : Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Fukuoka, July 29-31, 2009.

松永勇、中尾瞳、森田大輔、杉田昌彦：らい菌のミコール酸転移酵素によるミコール酸糖脂質の産生 第 82 回日本生化学会総会 神戸 平成 21 年 10 月 21-24 日

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**  
**LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS**

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in many biological processes, including embryogenesis, development of immune system, maintenance of tissue homeostasis and elimination of virus-infected and tumor cells. We found cell surface Fas antigen (Fas), which can directly mediate apoptosis-inducing signals into cells by stimulation with agonistic anti-Fas mAbs or Fas ligand. Our main research project is to understand the intracellular signal transduction mechanism of cell death including apoptosis and caspase-independent novel types of cell death and the biological significance/physiological role of cell death and cell death-regulating molecules. Investigations of molecular mechanisms and physiological roles of cell death are important for a better understanding of mammalian immune system, embryogenesis and tumorigenesis.

**1) Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase: M. KIRIYAMA, Y. KOBAYASHI, M. SAITO, F. ISHIKAWA and S. YONEHARA**

FLASH has been shown to be required for S phase progression and to interact with a nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus (NPAT), a component of Cajal bodies in the nucleus and an activator of histone transcription. We investigated the role of human FLASH by using an inducible FLASH-knockdown system in the presence or absence of various mutant forms of mouse FLASH. While carboxyl-terminal deletion mutants of FLASH, which do not interact with NPAT, can support S phase progression, its amino-terminal deletion mutants, which are unable to self-associate, cannot support S phase progression, replication-dependent histone transcription or formation of Cajal bodies. Furthermore, FLASH was shown to be associated with arsenite resistance protein 2 (ARS2) through its central region composed of only 13 amino acids. The expression of ARS2 and interaction between FLASH and ARS2 are required for S phase progression. Taken together, FLASH functions in S phase progression through interaction with ARS2.

**2) FLASH is indispensable for early embryonic development but dispensable for proliferation of ES cells: Y. MINAMIDA and S. YONEHARA**

FLASH was identified in our laboratory as a caspase-8-associated protein. Recent studies have suggested that FLASH has a wide variety of functions such as in cell cycle progression, transcriptional activation, and histone expression. Physiological in vivo function of

FLASH, however, has remained largely unclear. We analyzed a FLASH mutant mouse, which was generated by Lexicon Pharmaceuticals, Inc., using gene trapping technology. This mouse was turned out to be a FLASH promoter mutant, and the FLASH mutant allele was shown to express neither FLASH mRNA nor protein in most of organs except for testis. Heterozygous FLASH mutant mouse (FLASH<sup>mut/+</sup>) showed a normal phenotype; however, no homozygous newborn mice (FLASH<sup>mut/mut</sup>) was obtained by heterozygous intercrosses. In addition, FLASH<sup>mut/mut</sup> mice were shown to die between E3.5 and E8.5. To further investigate this early embryonic lethality, we cultured blastocysts in vitro, showing that only homozygous FLASH mutant blastocysts could neither adhere to the gelatin-coated dish, nor hatch from their zona pellucida. These data suggest that FLASH mutant mouse dies around pre-implantation stage. To examine the function of FLASH in early embryogenesis, we generated inducible FLASH knockout ES cell clones using Cre-loxP system. Analyses of the clones indicate that FLASH is dispensable for proliferation of ES cells and is expressed in ES clones-derived cells with some lineages-specific markers. In addition, FLASH-deficient ES cells could differentiate to various types of cells in either neural, cardiac or trophoblast lineage. Collectively, FLASH was indicated to play an essential role in pre-implantation stage, while FLASH is not involved in proliferation or elemental differentiation of inner cell mass.

### **3) An essential role of Wnt signals in the differentiation of mouse ES cells: A. MURAKAMI**

Wnt signals were reported to play an important role in the differentiation at the gastrulation stage during embryogenesis. We have been studying a role of Wnt signals in the differentiation process using mouse ES cells. The ES cells differentiate into three germ layers, endoderm, mesoderm and ectoderm, if cultured as a floating aggregate called an embryoid body. Among Wnt family members, we identified Wnt8a as well as Wnt3 as a signaling molecule essential for the mesoderm/endoderm induction.

Knock down of Wnt3 expression by introducing the shRNA did not affect on neural differentiation, indicating that Wnt3 is not involved in the ectoderm induction. On the other hand, knock down of Wnt8a resulted in repression of the neuronal differentiation. Thus, it is likely that Wnt8a is involved in some stage(s) in the process from ectoderm induction to neuronal differentiation. A preliminary result has shown that Wnt8a is essential at the very early stage in the differentiation of ES cells. We are now analyzing its function at the stage in detail.

#### **LIST OF PUBLICATIONS**

#### **DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**

#### **LABORATORY OF TUMOR BIOGENESIS**

- Kobayashi Y, and Yonehara S. Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. *Cell Death Differ*, 16, 139-150, 2009.
- Kiriyama M, Kobayashi Y, Saito M, Ishikawa F, and Yonehara S. Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase. *Mol Cell Biol*, 29, 4742-4756, 2009.
- Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, and Isikawa F. RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway. *Mol Cell*, 36, 193-206, 2009.
- 

Shin Yonehara. “Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids” The 5th NTU-Kyoto U Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. Kyoto, May 23, 2009.

米原 伸：「Fas下流分子の多様な生理機能」、生理学研究所研究会 「細胞死研究の多面的、包括的理解に向けて」、岡崎市、3月17日、2009.

米原 伸：「新規細胞死と新しい細胞周期S期進行の制御機構について」、第6回 東レ先端融合研究シンポジウム「バイオ基礎研究から創薬への流れ」、鎌倉市、6月16日、2009.

米原 伸：「細胞増殖シグナルと細胞死シグナルのクロストーク：FLASH/casp8ap2を中心として」、第11回 京都大学生命科学研究科シンポジウム、京都市、7月3日、2009.

米原 伸：「アポトーシスと非アポトーシス細胞死」、神奈川歯科大学学会 平成21年度第6回 研究談話会、横須賀市、10月7日、2009.

**DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**  
**LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

**1) Studies on the life cycle of blood-borne HCV using novel in vitro culture system : H. H. ALY, T. YAMGUCHI, Y. QI, K. SHIMOTOHNO and M. HIJIKATA**

Important progress in hepatitis C virus (HCV) research has been achieved since the recent development of the recombinant HCV JFH1 system. An efficient in vitro HCV replication system that can be used for the study of the life cycle of blood borne natural HCV from various patients, however, has not been established. Here, we describe the development of an in vitro system reproducing the life cycle of natural HCV using an immortalized primary human hepatocyte cell line that we previously established. We used a three-dimensional (3D) hollow fiber culture system that enabled us to observe not only the enhanced infectivity of natural HCV and its long-term replication but also the production of infectious particles. The patterns of proliferation and production of infectious particles varied among the different HCV strains tested. Using this in vitro infection system, we observed HCV strain-dependent events that reflect virus-cell interactions at the early phase of natural HCV infection, including apoptotic cell death and the stimulation of interferon- $\alpha$  production after infection. This in vitro system provides a significant tool for the analysis of virus-host interactions, and may allow the development of new anti-HCV strategies specific to various strains of natural HCV.

**2) Three dimensional culture of the immortalized human hepatocyte available of drug search and screening for blood-borne hepatitis C virus : H. H. ALY, K. SHIMOTOHNO and M. HIJIKATA**

Hepatitis C virus (HCV) is a serious health problem worldwide, with an estimated 3% infection of the world's population. HCV standard therapy, however, is still insufficient for treating many patients, showing the requirement for the development of more effective anti-HCV agents. Due to the high polymorphism and sequence variability of natural HCV variants, the limited number of available recombinant HCV replication models may not be efficient for this study. Here the development of an in vitro system supporting the infection and replication of natural HCV from patient's blood was demonstrated by using an immortalized primary human hepatocyte cell line cultured in a three-dimensional (3D) thermoreversible gelation polymer culture system. This system made it possible for us to observe the enhanced infectivity and replication of natural HCV. Compared the gene expression profile of the cells cultured in 3D culture system with that in normal flat one, up regulation of several genes activated by peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) signaling was observed. Furthermore, the effect of PPAR $\alpha$  signaling on the modulation

of HCV replication was also analyzed by this system,. This in vitro system provides significant information for the search and development of new anti-HCV strategies specific to various strains of natural HCV.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **DEPARTMENT OF VIRAL ONCOLOGY**

### **LABORATORY OF HUMAN TUMOR VIRUSES**

Aly H. H., Qi Y., Atsuzawa K., Usuda N., Takada Y., Mizogami M., Shimotohno K and Hijikata M.: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50(3), 689-696, 2009.

Aly H. H., Shimotohno K and Hijikata M.: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009

Murata T., Sato Y., Nakayama S., Kudoh A., Iwahori S., Isomura H., Tajima M., Hishiki T., Ohshima T., Hijikata M., Shimotohno K and Tsurumi T.: TORC 2, a coactivator of CREB, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein, *J. Biol. Chem.* 284, 8033-8041, 2009

Sugiyama K., Suzuki K., Nakazawa T., Funami K., Hishiki T., Ogawa K., Saito S., Shimotohno K.W., Suzuki T., Shimizu Y., Tobita S., Hijikata M., Takaku H and Shimotohno K.: Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol.*, 83(13), 6922-6928, 2009.

Goto K., Watashi K., Inoue D., Hijikata M and Shimotohno K.: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 100 (10), 1943-1950, 2009.

---

Aly H. H., Tsutsui C., Qi Y., Kushima Y., Fujita T., Shimotohno K and Hijikata M.: TLR8 induces RIG-I gene expression and efficient interferon response against HCV infection in human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009

Aly H. H., Shimotohno K., and Hijikata M.: Drug screening of blood-borne HCV using 3D cultured immortalized human hepatocytes. 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Nice, France, Oct 3-7 2009

久島透嘉、脇田隆字、土方誠：coreの変異体を用いたC型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、第57回日本ウイルス学会学術総会、東京、平成21(2009)年10月26日

阿部雄一、脇田隆字、土方誠：ケミカルバイオロジー手法を用いたC型肝炎ウイルス感染性粒子形成機構解明の試み

第32回日本分子生物学会年会、横浜、平成21(2009)年12月9-12日



筒井智恵子、アリ・ハッサン・フセイン・久島透嘉、土方誠：C 型肝炎ウイルスを抑制する転写因子 IRF7 の肝特異的発現制御機構の解析

第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21(2009)年 12 月 9-12 日

土方 誠：血液由来 HCV の感染増殖を再現する新しい培養細胞系の構築

第 18 回広島肝臓研究会、広島、平成 21(2009)年 11 月 6 日

**DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**  
**LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS**

**1) Identification of Loss of Function Mutations in Human Genes Encoding RIG-I and MDA5: T. SHIGEMOTO, M. KAGEYAMA, R. HIRAI, M. YONEYAMA and T. FUJITA**

RIG-I and MDA5 are essential for detecting viral RNA and triggering antiviral responses, including production of type I IFN. We analyzed the phenotype of non-synonymous mutants of human RIG-I and MDA5 reported in databases by functional complementation in cell cultures. Of 7 missense mutations of RIG-I, S183I, which occurs within the second CARD repeat, inactivated this domain and conferred a dominant inhibitory function. Of 10 mutants of MDA5, 2 exhibited loss of function. A non-sense mutation, E627\*, resulted in deletion of the C-terminal region and dsRNA-binding activity. Another loss of function mutation, I923V, which occurs within the CTD, did not affect dsRNA-binding activity, suggesting a novel and essential role for this residue in the signaling. The A946T mutation of MDA5, which occurs within the CTD and has been implicated in type I diabetes by genetic analyses, affected neither dsRNA binding nor IFN gene activation. These results provide new insights into the structure-function relationship of RLRs as well as into human RLR polymorphisms and antiviral innate immunity.

**2) Identification of the RNA Recognition Loop in C-terminal Domains of RIG-I and LGP2: K. TAKAHASHI, H. KUMETA, N. TSUDUKI, M. YONEYAMA, R. HIRAI, R. NARITA, T. SHIGEMOTO, M. HORIUCHI, K. OGURA, T. FUJITA and F. INAGAKI**

The RIG-I like receptor (RLR) comprises three homologues: RIG-I (Retionic acid inducible gene-I), MDA5 (Melanoma differentiation associated gene 5) and LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2). Each RLR senses different viral infections by recognizing replicating viral RNA in the cytoplasm. The RLR contains a conserved C-terminal domain (CTD) which is responsible for the binding specificity to the viral RNAs including double stranded RNA (dsRNA) and 5' phosphorylated single stranded RNA (5'ppp-ssRNA).

Here, the solution structures of the MDA5 and LGP2 CTD domains were solved by NMR and compared with that of RIG-I CTD. The CTD domains have similar folds and similar basic surfaces to each other but there is a distinct structural feature of a RNA binding loop; The LGP2 and RIG-I CTD domains have a large basic groove, one bank of which is formed by the RNA binding loop but MDA5 exhibits an extensive open and flat surface. The NMR chemical shift perturbation study showed that dsRNA and 5'ppp-ssRNA are bound to the basic groove of RIG-I and LGP2 CTDs but

much more weakly to the basic surface of MDA5 CTD, indicating that the conformation of the RNA binding loop is responsible for the sensitivity against the viral RNA. Mutation study of the basic surface and the conserved residues in the RNA binding loop supports the conclusion from the structure studies. Thus, the CTD is responsible for the binding affinity to the viral RNAs and determines the sensitivity of RLRs toward different virus.

**3) RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease: S. SATO, K. HOSHINO, T. SATOH, T. FUJITA, Y. KAWAKAMI, T. FUJITA and M. KUWANA**

*Objective.* To identify novel autoantibodies specific for dermatomyositis (DM), especially those specific for clinically amyopathic DM (C-ADM).

*Methods.* Autoantibodies were analyzed by immunoprecipitation in 298 serum samples from patients with various connective tissue diseases (CTDs) or idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Antigen specificity of the sera was further examined by immunoblotting and indirect immunofluorescence (IF). The disease specificity and clinical features associated with the antibody of interest were determined.

*Results.* Eight sera recognized a polypeptide of ~140 kd (CADM-140 autoantigen) by immunoprecipitation and immunoblotting. Immunoreactivity was detected in the cytoplasm, and indirect IF revealed a granular or reticular pattern. Anti-CADM-140 antibodies were detected in 8 of 42 patients with DM, but not in patients with other CTDs or IPF. Interestingly, all 8 patients with anti-CADM-140 antibodies had C-ADM. Among 42 patients with DM, those with anti-CADM-140 autoantibodies had significantly more rapidly progressive interstitial lung disease (ILD) when compared with patients without anti-CADM-140 autoantibodies (50% versus 6%;  $P=0.008$ ).

*Conclusion.* These results indicate that the presence of anti-CADM-140 autoantibodies may be a novel marker for C-ADM. Further attention should be directed to the detection of rapidly progressive ILD in those patients with anti-CADM-140 autoantibodies.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

### **LABORATORY OF MOLECULAR GENETICS**

- Shigemoto, T., Kageyama, M., Hirai, R., Zheng, J-P., Yoneyama, M., Fujita, T.: Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and mda5: Implications for resistance to type I diabetes. J. Biol. Chem. 284, 13348-13354 (2009)
- Takahashi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., Inagaki, F.: Solution Structures of MDA5 and LGP2 C-terminal Domains: Identification of the RNA Recognition Loop in RIG-I Like Receptors. J. Biol. Chem. 284, 17465-17474 (2009)
- Sato, S., Hoshino, K., Satoh, T., Fujita, T., Kawakami, Y., Fujita, T. and Kuwana, M.: RNA helicase encoded by melanoma differentiation-associated gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis: association with rapidly progressive interstitial lung disease. Arthritis & Rheumatism. 60, 2193-2200 (2009)
- Spiropoulou CF, Ranjan P, Pearce MB, Sealy TK, Albariño CG, Gangappa S, Fujita T, Rollin PE, Nichol ST, Ksiazek TG, Sambhara S.: RIG-I activation inhibits ebolavirus replication. Virology. 329, 11-15 (2009)
- Yoneyama, M. and Fujita, T.: RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunological Reviews 227, 54-65 (2009)
- Bowzard JB, Ranjan P, Sambhara S, Fujita T. : Antiviral defense: RIG-Ing the immune system to STING. Cytokine Growth Factor Rev. 20, 1-5 (2009)
- Ranjan, P., Bowzard, J.B., Schwerzmann, J.W., Jeisy-Scott, V., Fujita, T. and Sambhara, S.: Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. Trends in Molecular Medicine 15, 359-368 (2009)
- Fujita T.: A nonself RNA pattern: tri-p to panhandle. Immunity 31, 4-5 (2009)

成田亮、米山光俊、藤田尚志：自然免疫におけるウイルス核酸認識機構 Medical Science Digest 35(6)：6-9：2009

尾野本浩司、藤田尚志：ウイルス感染における細胞内センサーの機能解析 蛋白質 核酸 酵素 増刊「感染現象」54(8)：901-907：2009

藤田尚志：細胞内ウイルスセンサー ウイルス感染認識機構をさぐる はじめに 医学のあゆみ 229 (11)：1045-1046：2009

小野口和英、米山光俊、藤田尚志：細胞内ウイルスセンサー ウイルス感染認識機構をさぐる ウイルス核酸の認識と抗ウイルス自然免疫反応 医学のあゆみ 229 (11)：1047-1050：2009

小野口和英、藤田尚志：自己・非自己 RNA の識別を基盤とした抗ウイルス免疫機構 蛋白質 核酸 酵素 増刊 54(16)：2226-2232：2009

---

藤田尚志：ウイルス増殖を感知する細胞内センサー・RIG-I ファミリー 2009. 7. 18 第7回肝臓病研究会シンポジウム 特別講演 品川

- Kazuhide Onoguchi, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita: Mitochondrial dynamics and innate antiviral responses regulated by RIG-I-like receptor. 2009.9.10 The 9th Awaji international Forum on Infection and Immunity
- Koji Onomoto, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita: Intracellular localization of RIG-I in virus infected cells. 2009.9.10 The 9th Awaji international Forum on Infection and Immunity
- Ryo Narita, Kiyohiro Takahashi, Hiroyuki Kumeta, Natsuko Tsuduki, Taeko Shigemoto, Reiko Hirai, Mitsutoshi Yoneyama, Masataka Horiuchi, Kenji Ogura, Takashi Fujita, Fuyuhiko Inagaki: Structural and functional analysis of RIG-I-like receptors. 2009.9.10 The 9th Awaji international Forum on Infection and Immunity
- Takashi Fujita: Activation of an antiviral program through the cytoplasmic Recognition of non-self RNA patterns by RLR. October 19, 2009 Tri-Society Annual Conference, Lisbon Portugal
- Kazuhide Onoguchi, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita: Mitochondrial dynamics and innate antiviral responses regulated by RIG-I-like receptor October 21, 2009 Tri-Society Annual Conference, Lisbon Portugal
- 西川千紘、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志：血球系細胞活性化時における RIG-I シグナルの機能解析 2009. 10. 23 第 82 回日本生化学会大会 神戸
- 影山麻衣子, 成田亮, 高橋清大, 米山光俊, 藤田尚志: ウイルス RNA センサータンパク質 RIG-I の活性化機構の解明 The identification of the auto-repressor domain of RIG-I. 2009. 12. 9 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜
- 常喜儒彦、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志： ウイルス RNA センサー RIG-I-like receptor (RLR) の細胞内局在の解析/Subcellular localization of viral RNA sensors, RIG-I-like receptors (RLRs). 2009. 12. 9 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜
- Ryota Ouda, Koji Onomoto, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita: Functional analysis of RIG-I inducible microRNA. 2009. 12. 11 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜
- 高松詩穂理、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志： IPS-1 による抗ウイルス応答シグナル制御機構の解析 2009. 12. 11 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜
- 常喜儒彦、尾野本浩司、米山光俊、藤田尚志: ウイルス RNA センサー RIG-I-like receptor (RLR) の細胞内局在の解析/Subcellular localization of viral RNA sensors, RIG-I-like receptors (RLRs). 2009. 12. 11 第 32 回日本

**DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**  
**LABORATORY OF BIOCHEMISTRY**

In eukaryotic cells, genes are usually separated by introns into multiple exons that should be spliced together. In addition, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule. In addition, Assistant Prof. Kitabatake's subgroup is focusing on quality control mechanisms of ribosome particles.

**1) RNA distribution in the cell: I. TANIGUCHI, H. KIRIU, T. SUZUKI, A. MCCLOSKEY, R. TAKEMURA, K. AKIISHI, T. TAKEIWA and H. IZUMI**

**1-1) Identity elements used in mRNA export**

Different RNA species, such as tRNAs, U snRNAs, mRNAs and rRNAs, utilize distinct export pathways, i.e., distinct sets of export factors. Accumulating evidence shows that the pathway of RNA export can influence the fate of a given RNA in the cytoplasm, indicating the biological importance of the choice of RNA export pathway. This means that the cellular export machinery must be able to discriminate distinct RNA species, and therefore each RNA species should have identifying features that specify its export pathway ("identity elements"). We are mainly focusing on mRNAs and performing a systematic search for identity elements used in export of mRNAs. To this end, we make various chimeric RNAs between mRNA and U1 snRNA, and look for RNA features that make the chimeric RNAs behave like an mRNA rather than a U snRNA in nuclear export process.

**1-2) Molecular mechanisms for nuclear retention of intron-containing mRNA precursors**

Intron-containing pre-mRNAs are normally retained in the nucleus until they are spliced to produce mature mRNAs that are exported to the cytoplasm. The nuclear retention of pre-mRNAs is essential for proper gene expression. It secures pre-mRNAs to be efficiently spliced since splicing mainly occurs in the nucleus. It also secures pre-mRNAs not to be translated since translation of pre-mRNAs would possibly produce toxic abnormal proteins for the cell. However, the nuclear retention mechanisms of pre-mRNAs are not well understood (reviewed in 3, 4). We are trying to understand such mechanisms.

**2) rRNA quality control mechanisms: M. KITABATAKE, A. MIYATA, K. FIJII and T. SAKATA**

How the eukaryotic cells deal with non-functional RNA molecules that were either mutated or damaged? We are searching for novel RNA quality control mechanisms in mammalian and yeast cells by mainly focusing on ribosomal RNAs.

Quality control mechanisms operate in various steps of ribosomal biogenesis to ensure the production of functional ribosome particles. It was previously reported that mature ribosome particles containing nonfunctional mutant rRNAs are also recognized and selectively removed by a cellular quality control system (nonfunctional rRNA decay; NRD). Here, we show that the NRD of 25S rRNA requires a ubiquitin E3 ligase component Rtt101p and its associated protein Mms1p, previously identified as factors involved in DNA repair. We revealed that a group of proteins associated with nonfunctional ribosome particles are ubiquitinated in a Rtt101-Mms1-dependent manner. 25S NRD was disrupted when ubiquitination was inhibited by the overexpression of modified ubiquitin molecules, demonstrating a direct role for ubiquitin in this pathway. These results uncovered an unexpected connection between DNA repair and the quality control of rRNAs. Our findings support a model in which responses to DNA and rRNA damages are triggered by a common ubiquitin ligase complex, during genotoxic stress harmful to both molecules

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **DEPARTMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

### **LABORATORY OF BIOCHEMISTRY**

- Mabuchi, N., Masuyama, K. and Ohno, M. Immunoprecipitation analysis to study RNA-protein interactions in *Xenopus* oocytes. *Methods Mol. Biol.* 488:257-65. 2009.
- Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K. and Ohno, M. Isolation and characterization of postsplicing lariat-intron complexes. *Nucleic Acids Res.* 37, 891-902. 2009.
- Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M. and Inoue, I. 1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative Splicing. *Nucleic Acids Res.* Vol. 37, No.6 1907-1914. 2009.
- Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and Ohno, M. A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* 23:963-74. 2009.
- Kataoka, N., Fujita, M. and Ohno, M. Functional association of the microprocessor complex with the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 29:3243-54. 2009.
- 大野睦人 核-細胞質間のRNA分配制御 蛋白質 核酸 酵素 Vol54 No 16 2114-2 2009.
- 片岡直行、芳本玲、藤田恵、大野睦人 イントロンの代謝機構 蛋白質 核酸 酵素 Vol54 No.16 2060-65 2009.
- 北畠真、藤井耕太郎、大野睦人 リボソーム RNA の品質管理 蛋白質 核酸 酵素 Vol54 No.16 2195-200 2009.

- 
- Sakata, T., Kitabatake, M., Fujii, K. and Ohno, M : Selective degradation of non-functional ribosomal protein in *S.cerevisiae*. The 7th International Student Seminar. Kyoto, Japan. March 12, 2009.
- Takeiwa, T., Taniguchi, I. and Ohno, M : Searching for RNA Elements for Nuclear Pre-mRNA Retention. The 7th International Student Seminar. Kyoto, Japan. March 12, 2009.
- Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K. and Ohno, M. Isolation and characterization of post-splicing lariat-intron complexes. The 7th International Student Seminar. Kyoto, Japan. March 12, 2009.
- Kitabatake, M., Fujii, K., Sakata, T. and Ohno, M : A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. Fourteenth annual Meeting of the RNA Society 2009. Madison, USA. May 26-31, 2009.
- Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M. and Ohno, M : Functional Decay of Nonfunctional 25S rRNA Requires Proteasome Activity. Fourteenth annual Meeting of the RNA Society 2009. Madison, USA. May 26-31, 2009.
- Kataoka, N., Fujita, M. and Ohno, M : Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome. Eukaryotic mRNA processing. USA. Aug 18-22, 2009.
- Sakata, T., Kitabatake, M., Fujii, K., Miyata, A. and Ohno, M : Selective degradation of nonfunctional ribosomal protein in *S.cerevisiae*. Ribosome Synthesis Meeting. Regensburg, Germany. Aug 26-30, 2009.
- Kitabatake, M., Fujii, K., Sakata, T. and Ohno, M : A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. Ribosome Synthesis Meeting. Regensburg, Germany. Aug 26-30, 2009.
- Fujii, K., Sakata, T., Kitabatake, M., Miyata, A. and Ohno, M : Functional Decay of Nonfunctional 25S rRNA Requires Proteasome Activity. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. Sep 13-14, 2009.
- 竹岩俊彦、谷口一郎、大野睦人 : mRNA 前駆体の核内保持に必要なシス配列の探索、RNA フロンティアミーティング 2009、神奈川県三浦郡、2009 年 9 月 26-28 日
- 北畠真、藤井耕太郎、坂田知子、宮田敦美、大野睦人 : リボソーム RNA の品質管理におけるユビキチンの新たな役割、第 82 回 日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日
- マクローズキー亜紗子、谷口一郎、新名主カオリ、大野睦人 : 核外輸送において mRNA と UsnRNA を識別する機構、第 32 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 竹村玲子、大野睦人 : HeLa 細胞における mRNA 前駆体核内保持因子の探索、第 32 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 藤井耕太郎、坂田知子、宮田敦美、北畠真、大野睦人 : 機能不全 rRNA の品質管理機構~ユビキチン-プロテアソーム系の関わり、第 32 回日本分子生物学会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日
- 鈴木達也、大野睦人 : U snRNA 核外輸送における PHAX の新しい機能、第 6 回 京都大学ウ



イルス研究所学術交流会、京都、2009 年 12 月 15 日

**DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**  
**LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS**

- 1) **Overlapping in short motif sequences for binding to human REV7 and MAD2 proteins: T. HANAFUSA, T. HABU<sup>1</sup>, J. TOMIDA<sup>1</sup>, E. OHASHI<sup>2</sup>, Y. MURAKUMO<sup>3</sup> and H. OHMORI** (<sup>1</sup>Radiation Biology Center, Kyoto University, <sup>2</sup>Kyushu University, <sup>3</sup>Nagoya University)

Polζ, a DNA polymerase specialized for trans-lesion DNA synthesis (TLS), is comprised of two subunits, the REV3 catalytic subunit and the REV7 accessory subunit. The human REV7 (hREV7) protein is known to interact with hREV3, hREV1 (another TLS protein) and some other proteins such as ADAM9 and ELK-1. hREV7 is alternatively termed hMAD2L2, because its primary sequence shows 26% identity to that of hMAD2 that plays crucial roles in spindle assembly checkpoint (SAC) *via* interactions with hMAD1 or hCDC20. Here we have investigated the molecular basis for the interactions of hREV7/MAD2L2 and hMAD2 with their binding partners. Our results revealed that a short sequence of hREV3 is necessary and sufficient for interaction with hREV7. Surprisingly, hMAD2 also binds to the hREV7-binding sequence in hREV3, while hMAD2 does not bind to a similar sequence in ADAM9 or ELK-1 and hREV7 does not bind to the hMAD2-binding sequence in hMAD1 or hCDC20. We discuss how hREV7 and hMAD2 recognize their binding partners, and how hREV3 and hREV7 might be involved in SAC. Ref. Hanafusa *et al.*, Genes Cells, in press.

- 2) **Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases: H. OHMORI, T. HANAFUSA, E. OHASHI<sup>1</sup> and C. VAZIRI<sup>2</sup>** (<sup>1</sup>Kyushu University, <sup>2</sup>University of North Carolina, USA)

All organisms have multiple DNA polymerases specialized for translesion DNA synthesis (TLS) on damaged DNA templates. Mammalian TLS DNA polymerases include Pol η, Pol ι, Pol κ and Rev1 (all classified as ‘Y-family’ members) and Pol ζ (a ‘B-family’ member). Y-family DNA polymerases have highly structured catalytic domains; however, some of these proteins adopt different structures when bound to DNA (such as archaeal Dpo4 and human Pol κ), while others maintain similar structures independently of DNA binding (such as archaeal Dbh and *S. cerevisiae* Pol η). DNA binding-induced structural conversions of TLS polymerases depend on flexible regions present within the catalytic domains. In contrast, non-catalytic regions of Y-family proteins, which contain multiple domains and motifs for interactions with other proteins, are predicted to be mostly unstructured, except for short regions corresponding to ubiquitin-binding domains. We

discussed how the organization of structured and unstructured regions in TLS polymerases is relevant to their regulation and function during lesion bypass.

**3) Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. A. HISHIKI<sup>1</sup>, H. HASHIMOTO<sup>1</sup>, T. HANAFUSA, K. KAMEI, E. OHASHI, T. SHIMIZU<sup>1</sup>, H. OHMORI and M. SATO<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Yokohama City University)**

Translesion synthesis (TLS) is a DNA damage tolerance mechanism that allows continued DNA synthesis, even in the presence of damaged DNA templates. Mammals have multiple DNA polymerases specialized for TLS, including Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , and Pol $\kappa$ . These enzymes show preferential bypass for different lesions. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which functions as a sliding clamp for the replicative polymerase Pol $\delta$ , also interacts with the three TLS polymerases. Although many PCNA-binding proteins have a highly conserved sequence termed the PCNA-interacting protein box (PIP-box), Pol $\eta$ , Pol $\iota$  and Pol $\kappa$  have a noncanonical PIP-box sequence. In response to DNA damage, Lys-164 of PCNA undergoes ubiquitination by the RAD6-RAD18 complex, and the ubiquitination is considered to facilitate TLS. Consistent with this, these three TLS polymerases have one or two ubiquitin binding domains and are recruited to replication forks via interactions with ubiquitinated PCNA involving the noncanonical PIP-box and ubiquitin-binding domain. However, it is unclear how these TLS polymerases interact with PCNA. To address the structural basis for interactions between different TLS polymerases and PCNA, we determined crystal structures of PCNA bound to peptides containing the noncanonical PIP-box of these polymerases. We showed that the three PIP-box peptides interact with PCNA in different ways, both from one another and from canonical PIP-box peptides. Especially, the PIP-box of Pol $\iota$  adopts a novel structure. Furthermore, these structures enable us to speculate how these TLS polymerases interact with Lys-164-monoubiquitinated PCNA. Our results provide clues to understanding the mechanism of preferential recruitment of TLS polymerases to the stalled forks.

**4) Interaction with DNA polymerase  $\eta$  is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells: J. AKAGI<sup>1</sup>, C. MASUTANI<sup>1</sup>, Y. KATAOKA<sup>1</sup>, T. KAN, E. OHASHI, T. MORI<sup>2</sup>, H. OHMORI and F. HANAOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup>Nara Medical University)**

Defects in the gene encoding human Pol $\eta$  result in xeroderma pigmentosum variant (XP-V), an inherited cancer-prone syndrome. Pol $\eta$  catalyzes efficient and accurate translesion DNA synthesis (TLS) past UV-induced lesions. In addition to Pol $\eta$ , human cells have multiple TLS polymerases such as Pol $\iota$ , Pol $\kappa$ , Pol $\zeta$  and REV1. REV1 physically interacts with other TLS

polymerases, but the physiological relevance of the interaction remains unclear. We developed an antibody that detects the endogenous REV1 protein and found that human cells contain about 60,000 of REV1 molecules per cell as well as Pol $\eta$ . In un-irradiated cells, formation of nuclear foci by ectopically expressed REV1 was enhanced by the co-expression of Pol $\eta$ . Importantly, the endogenous REV1 protein accumulated at the UV-irradiated areas of nuclei in Pol $\eta$ -expressing cells but not in Pol $\eta$ -deficient XP-V cells. UV-irradiation induced nuclear foci of REV1 and Pol $\eta$  proteins in both S-phase and G1 cells, suggesting that these proteins may function both during and outside S phase. We reconstituted XP-V cells with wild-type Pol $\eta$  or with Pol $\eta$  mutants harboring substitutions in phenylalanine residues critical for interaction with REV1. The REV1-interaction-deficient Pol $\eta$  mutant failed to promote REV1 accumulation at sites of UV-irradiation, yet (similar to wild-type Pol $\eta$ ) corrected the UV sensitivity of XP-V cells and suppressed UV-induced mutations. Interestingly however, spontaneous mutations of XP-V cells were only partially suppressed by the REV1-interaction deficient mutant of Pol $\eta$ . Thus, Pol $\eta$ -REV1 interactions prevent spontaneous mutations, probably by promoting accurate TLS past endogenous DNA lesions, while the interaction is dispensable for accurate Pol $\eta$ -mediated TLS of UV-induced lesions.

## LIST OF PUBLICATIONS

### DEPARTEMENT OF GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

### LABORATORY OF GENE INFORMATION ANALYSIS

- H. Ohmori, T. Hanafusa, E. Ohashi, C. Vaziri.: Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases. *Adv. Prot. Chem. Struct. Biol.* 78, 99-146, 2009.
- T. Kimura, T. Takeuchi, Y. Kumamoto-Yonezawa, E. Ohashi, H. Ohmori, C. Masutani, F. Hanaoka, F. Sugawara, H. Yoshida, Y. Mizushima.: Penicillins A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases. *Bioorg Med Chem.* 17, 1811-1816, 2009.
- A. Hishiki, H. Hashimoto, T. Hanafusa, K. Kamei, E. Ohashi, T. Shimizu, H. Ohmori, M. Sato.: Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* 284, 10552-10569, 2009.
- E. Ohashi, T. Hanafusa, K. Kamei, I. Song, J. Tomida, H. Hashimoto, C. Vaziri, H. Ohmori.: Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase  $\kappa$  function. *Genes Cells* 14, 101-111, 2009.
- J. Akagi, C. Masutani, Y. Kataoka, T. Kan, E. Ohashi, T. Mori, H. Ohmori, F. Hanaoka.: Interaction with DNA polymerase  $\eta$  is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair* 8, 585-599, 2009.
-

花房朋、村雲芳樹、富田純也、土生敏行、原幸大、橋本博、大橋英治、大森治夫：ヒト及び酵母における REV7 と MAD2 の結合モチーフ配列の部分的オーバーラッピング、第十回文部科学省特定研究領域「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ、長野、9 月 2 日～9 月 5 日、2009

花房朋、土生敏行、村雲芳樹、富田純也、原幸大、橋本博、大橋英治、大森治夫：ヒト及び酵母における REV7 と MAD2 の結合モチーフ配列の部分的オーバーラッピング、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日～12 月 12 日、2009

## **DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES**

### **LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION**

Our laboratory has made two major achievements. First, we have found that fetal and adult hematopoietic stem cells have different developmental potential to differentiate into lymphocytes. Second, we have demonstrated that interleukin-7 (IL-7) controls DNA recombination of lymphocyte antigen receptor genes by changing chromatin structure. Both of them are related with fundamental questions in medicine and biology.

Based on these findings, we are now pursuing research on development and regulation of the immune system, focusing on the following questions: (1) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by IL-7; (2) regulation of immune response by IL-7 receptor (IL-7R) expression; and (3) distribution and function of IL-7-producing cells in lymphoid organs.

#### **1) Activation of the mouse TCR $\gamma$ enhancers by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

The IL-7R controls local accessibility of joining (J)  $\gamma$  gene segments in the mouse T cell receptor (TCR)  $\gamma$  locus by recruiting signal transducers and activators of transcription (STAT) 5 and transcriptional coactivators to the J $\gamma$  germline promoters and inducing histone acetylation and germline transcription. Because STAT consensus motifs are conserved not only in the J $\gamma$  promoters but also in the TCR $\gamma$  3' enhancer (E $\gamma$ ) elements, it is possible that STAT5 interacts with and activates E $\gamma$ . To address this question, we first showed that the lysine 4 residue of H3 histone is substantially methylated at E $\gamma$ 1 and E $\gamma$ 4 elements in wild-type early thymocytes and that the levels of the methylation are reduced in IL-7R  $\alpha$ -chain (IL-7R $\alpha$ )-deficient mice. We also showed that STAT5 has potential to elevate histone acetylation of the E $\gamma$  elements in a cytokine-dependent cell line by cytokine stimulation. Next, we demonstrated that STAT5 is recruited to the STAT consensus motifs in the E $\gamma$  elements after cytokine stimulation and that transcription factors Runt-related (Runx) and c-Myb are constitutively recruited to E $\gamma$ . Furthermore, we showed that STAT5 augments basal E $\gamma$  activity controlled by Runx and c-Myb. These results suggest that STAT5 is recruited to the consensus motifs in the E $\gamma$  elements by cytokine stimulation and augments basal E $\gamma$  activity independently of Runx and c-Myb. Therefore, this study implies that the E $\gamma$  elements might be activated in two successive steps, first by Runx and c-Myb and next by STAT5.

#### **2) Accessibility control of TCR V $\gamma$ region by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

The signal of the IL-7R and STAT5 plays an essential role in  $\gamma\delta$  T cell development by inducing V-J recombination in the TCR $\gamma$  locus. Previously, we have shown that STAT5 binds to the J $\gamma$  promoters and controls chromatin accessibility by histone acetylation. However, little is known

on control mechanism of V $\gamma$  region by the IL-7R. To elucidate the regulation by STAT5, we first analyzed the chromatin status of V $\gamma$  region in primary thymocytes. The levels of histone H3 acetylation are high at V $\gamma$ 5, HsA element and V $\gamma$ 2 in Rag2<sup>-/-</sup> thymocytes but low in IL-7R $\alpha$ -deficient early thymocytes, suggesting that IL-7R signaling controls the accessibility of the V $\gamma$  region. In addition, high levels of histone H3 acetylation and germline transcription were induced at V $\gamma$ 5 and HsA by cytokine and STAT5 in cytokine-dependent Ba/F3 and other hematopoietic cell lines. Importantly, the chromatin accessibility of V $\gamma$ 5 gene is increased by cytokine signal. Furthermore, STAT5 was not recruited to a non-canonical STAT-binding motif in the V $\gamma$ 5 promoter by cytokine stimulation in vivo, while STAT5 binds to a consensus motif in the HsA element. In accordance with this result, STAT5 does not directly activate the V $\gamma$ 5 promoter by reporter assay. These results suggest that while STAT5 directly binds to HsA element and induces its histone acetylation, STAT5 indirectly activates the V $\gamma$ 5 promoter. Thus, this study implies a potential role of STAT5 in accessibility control of the V $\gamma$  region, especially at V $\gamma$ 5 and HsA.

**3) IL-7R controls differentiation of CD8 T cells and maintenance of peripheral T cells:  
S. TANI-ICHI, A. ABE and K. IKUTA**

The IL-7R is essential for differentiation and survival of T cells. We previously showed that IL-7R $\alpha$ -deficient mice have severely reduced numbers of  $\alpha\beta$  T cells and completely lack  $\gamma\delta$  T cells. However, the role of the IL-7R is not precisely determined in late stages of T cell development, because IL-7R $\alpha$ -deficient mice have profound detrimental effects on early thymocytes. To address this question, we established IL-7R $\alpha$ -floxed mice and crossed with CD4-Cre transgenic mice. In thymus, total cell numbers of CD4-Cre x IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> mice were similar to control mice. Whereas differentiation of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4 single positive (SP) cells and  $\gamma\delta$  T cells were not affected, the numbers of mature CD8 SP cells were markedly reduced in CD4-Cre x IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> thymus. In periphery, although CD4-Cre x IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> mice have comparable numbers of lymph nodes and Peyer's patches to control mice, there were a selective loss of CD4 and CD8 T cells and a selective gain of  $\gamma\delta$  T cells. These data demonstrate that the IL-7R is essential for differentiation of CD8 T cells in thymus and maintenance of naive CD4 and CD8 T cells in periphery.

**4) Distribution of IL-7-expressing cells in lymphoid tissues: T. HARA, S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

IL-7 is an essential cytokine for lymphocyte development and survival produced by mesenchymal and epithelial cells in lymphoid organs. However, little is known about the precise nature and distribution of IL-7-expressing cells in vivo. To address this question, we established IL-

7-GFP knock-in mice. We found that the majority of thymic epithelial cells (TEC) express GFP in the cortex and medulla. A large number of cortical TEC express GFP at high levels, while most medullary TEC express GFP at low levels. Their expression levels decrease gradually with aging. In the lymph node paracortex, fibroblastic reticular cells (FRC) express GFP at intermediate levels. In addition, we detected high levels of GFP expression in lymphatic endothelial cells at the medullary sinus. In the spleen, FRC scattered in the white pulp express GFP at low levels. Moreover, we found intermediate levels of GFP expression in the stromal cells lining the marginal zone and surrounding central arterioles. In the bone marrow, some VCAM-1<sup>+</sup> stromal cells express GFP at high levels. In the colon, some epithelial cells express high levels of GFP. Thus, the IL-7-GFP knock-in mouse reveals unreported types of IL-7-expressing cells and provides a powerful tool to analyze the IL-7-niche in the lymphoid organs.

**5) Local function of IL-7 produced by thymic and epidermal epithelial cells: T. HARA, B. LIANG, S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

IL-7 is an essential cytokine for lymphocyte development and survival produced by epithelial and mesenchymal cells. However, little is known about the local function of IL-7 produced by each cell type in the thymus and epidermis. To address this question, we established IL-7-floxed mice and firstly crossed with FoxN1-Cre transgenic (Tg) mice to obtain the conditional knockout mice deficient in IL-7 production from TEC. FoxN1-Cre x IL-7<sup>flox/flox</sup> mice showed 15-fold reduced numbers of thymocytes compared with control mice. In addition,  $\gamma\delta$  T and NKT cells are similarly reduced. Interestingly, the reduction and phenotype are less severe than IL-7<sup>-/-</sup> mice (50-fold reduction), suggesting the possibility that IL-7 produced by mesenchymal cells might play a minor role. In the spleen, the numbers of T cells are partially restored in FoxN1-Cre x IL-7<sup>flox/flox</sup> mice, indicating homeostatic expansion in the periphery. Therefore, these results suggest that IL-7 produced from TEC plays a major role in proliferation and survival of thymocytes. Next, we crossed the IL7-floxed mice with keratin 5 (K5)-Cre Tg mice to obtain the conditional knockout mice deficient in IL-7 production from epidermal epithelial cells. K5-Cre x IL-7<sup>flox/flox</sup> mice showed similar numbers of Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal  $\gamma\delta$  T cells to control mice. This result suggests that IL-7 produced by epidermal epithelial cells is dispensable for maintenance of  $\gamma\delta$  T cells in the epidermis.

**6) Detection of calreticulin in urine as a cancer marker: M. UEDA, S. KAGEYAMA<sup>1</sup> and T. YOSHIKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shiga University of Medical Science)**

Calreticulin (CRT) is the protein, molecular weight of which was reported to be 40 KD as the matured form, widely found in urogenital organs. We have reported the expression of CRT in



the unspliced form of 55 KD in the bladder cancer tissues (Kageyama et al. Clinical Chemistry, 2004). CRT of unspliced form was also found in urine from patients. CRT of 55 KD was considered to be a useful marker of urogenital cancer. We tried to introduce the assay system of 55 KD CRT by producing the monoclonal antibodies specifically reactive to 55 KD (full length form) CRT and 40 KD (spliced form) CRT respectively. 55 KD CRT was immunized to BALB/c mice, and spleen cells from mice were fused with myeloma cells. Seven clones producing IgG reactive to CRT were obtained. Two clones were reactive to only 55 KD CRT, and 5 clones were reactive to 55 KD and 40KD CTR. We now try to make the assay system of CRT in the urine of cancer patients with these monoclonal antibodies.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES**

### **LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION**

Tokuriki, A., Iyoda, T., Inaba, K., Ikuta, K., Fujimoto, S., Kumakiri, M., Yokota, Y. (2009). Dual role for Id2 in chemical carcinogen-induced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 30:1645-1650.  
Tani-ichi, S., Satake, M., and Ikuta, K. (2009). Activation of the mouse T cell receptor  $\gamma$  enhancers by STAT5. *Int. Immunol.*, 21:1079-1088.

---

Sumi, C., Tani-ichi, S., and Ikuta, K.: Accessibility of the TCR $\gamma$  locus by a chromatin remodeling factor BRG1. The 7th International Student Seminar, Kyoto, March 12, 2009.

Ikuta, K., Hara, T., Liang, B., and Tani-ichi, S.: Distribution and function of IL-7-producing stromal cells. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto, June 3, 2009.

生田宏一、原崇裕、梁冰霏、谷一靖江：胸線上皮細胞が産生する IL-7 の局所的役割. 第 39 回日本免疫学会学術集会、大阪、12 月 2 日、2009.

原崇裕、谷一靖江、梁冰霏、生田宏一：IL-7 産生ストローマ細胞のリンパ組織内分布. 第 39 回日本免疫学会学術集会、大阪、12 月 3 日、2009.

谷一靖江、佐竹正延、生田宏一： T 細胞分化過程における TCR 遺伝子座のサイレンシング. 第 39 回日本免疫学会学術集会、大阪、12 月 3 日、2009.

生田宏一、原崇裕、梁冰霏、谷一靖江：リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能. 第 32 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、横浜、12 月 9 日、2009.

**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSE**  
**LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION**

**1) Thioredoxin Regulates Cell Cycle via the ERK1/2-Cyclin D1 Pathway: M. MOCHIZUKI, Y.W. KWON, J. YODOI and H. MASUTANI**

Thioredoxin (TRX) is a key component of redox regulation and has been indicated to play an essential role in cell survival and growth. Here, we investigated the molecular mechanism of TRX in the regulation of cell survival and growth by using RNA interference (RNAi) in A549 lung cancer and MCF7 breast cancer cells. TRX knockdown did not significantly increase the basal level of cell death without exposure to stress, but CDDP-induced cell death was enhanced. Meanwhile, TRX knockdown resulted in significant cell-cycle arrest at the G(1) phase. Cyclin D1 expression was reduced by TRX knockdown at the protein and mRNA levels. TRX knockdown caused suppression of activation of the cyclin D1 promoter through elements including AP-1. TRX knockdown also reduced the levels of phosphorylated ERK1/2 and the nuclear translocation of ERK 1/2 induced by EGF. These results suggest that TRX is an important regulator of the cell cycle in the G(1) phase via cyclin D1 transcription and the ERK/AP-1 signaling pathways.

**2) Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF): regulatory role of TRX on MIF internalization and signaling: A. SON, N. KATO, T. HORIBE, Y. MATSUO, M. MOCHIZUKI, A. MITSUI, K. KAWAKAMI, H. NAKAMURA and J. YODOI**

Thioredoxin-1 (TRX) is a small (14 kDa) multifunctional protein with the redox-active site Cys-Gly-Pro-Cys. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a 12 kDa cytokine belonging to the TRX family. Historically, when we purified TRX from the supernatant of ATL-2 cells, a 12 kDa protein was identified along with TRX, which was later proved to be MIF. Here, we show that TRX and MIF form a complex in the cell and the culture supernatant of ATL-2 cells. Using a BIAcore assay, we confirmed that TRX has a specific affinity with MIF. We also found that extracellular MIF was more effectively internalized into the ATL-2 cells expressing TRX on the cell surface, than the Jurkat T cells which do not express surface TRX. Moreover, anti-TRX antibody blocked the MIF internalization, suggesting that the cell surface TRX is involved in MIF internalization into the cells. Furthermore, anti-TRX antibody inhibited MIF-mediated enhancement of TNF-alpha production from macrophage RAW264.7 cells. These results suggest that the cell surface TRX serves as one of the MIF binding molecules or MIF receptor component and inhibits MIF-mediated inflammatory signals.

**3) Thioredoxin-binding Protein-2 Deficiency Enhances Methionine-Choline Deficient Diet-induced Hepatic Steatosis but Inhibits Steatohepatitis in Mice: M.K. AHSAN, H. OKUYAMA, Y. HOSHINO, S. OKA, H. MASUTANI, J. YODOI and H. NAKAMURA**

In nonalcoholic fatty liver disease, oxidative stress is believed to play a crucial role as a second-hit for the progression of simple steatosis to steatohepatitis. Thioredoxin (TRX) is a potent antioxidant molecule that exerts anti-apoptotic and anti-inflammatory functions. TRX-binding protein-2 (TBP-2) is an endogenous negative regulator of TRX. Deficiency of TBP-2 in mice causes hyperlipidemia, hepatic steatosis, hypoglycemia, and bleeding tendency, resembling Reye syndrome in a fasting/glucose-deficient state. The aim of this study was to investigate the role of TBP-2 in the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). TBP-2-deficient (TBP-2(-/-)) and wild-type (WT) mice were fed either a normal or methionine-choline-deficient (MCD) diet for up to 10 weeks. Compared with WT mice, TBP-2(-/-) mice showed severe simple steatosis rather than steatohepatitis. However, oxidative stress determined by lipid peroxidation and DNA damage, neutrophil infiltration, and hepatic fibrosis were attenuated in TBP-2(-/-) mice. PCR analysis showed the expressions of fibrosis-inducing and inflammatory cytokine-related genes were less in TBP-2(-/-) mice. Moreover, leptin, SREBP1c, PPARgamma, and adipogenesis-lipogenesis-related genes were upregulated in TBP-2(-/-) mice. These results strongly suggested that TBP-2 might be involved in pathogenesis of NASH in WT mice, and inhibitors of TBP-2 could be useful in the prevention or treatment of NASH.

**4) Thioredoxin binding protein 2 modulates natural killer T cell-dependent innate immunity in the liver: possible link to lipid metabolism: H. OKUYAMA, T. YOSHIDA, A. SON, S. OKA, D. WANG., R. NAKAYAMA, H. MASUTANI, H. NAKAMURA, Y. NABESHIMA and J. YODOI**

Thioredoxin binding protein 2 (TBP2) plays a regulatory role in lipid metabolism and immune regulation. We previously reported the effect of TBP2 loss-of-function on lipid metabolism using TBP2 knockout (TBP2KO) mice. In this study, we employed TBP2 transgenic (TBP2TG) mice to analyze the in vivo effect of TBP2 gain-of-function. We revealed a decrease in the percentage of hepatic natural killer T (NKT) cells in TBP2KO mice and an increase in the percentage of hepatic NKT cells in TBP2TG mice. The TBP2KO mice were resistant to concanavalin A (ConA)-induced hepatitis, but they were highly susceptible to other types of hepatitis. TBP2 modulates lipid metabolism as well as NKT cell activity. Moreover, TBP2 expression was increased significantly in klotho-deficient mice, which exhibit a syndrome resembling aging human phenotypes. TBP2 may play multiple roles in lipid metabolism, innate

immunity, and aging.

**5) Physical and functional interaction of transmembrane thioredoxin-related protein with major histocompatibility complex class I heavy chain: redox-based protein quality control and its potential relevance to immune responses: Y. MATSUO, H. MASUTANI, A. SON, S. KIZAKA-KONDOH and J. YODOI**

In the endoplasmic reticulum (ER), a variety of oxidoreductases classified in the thioredoxin superfamily have been found to catalyze the formation and rearrangement of disulfide bonds. However, the precise function and specificity of the individual thioredoxin family proteins remain to be elucidated. Here, we characterize a transmembrane thioredoxin-related protein (TMX), a membrane-bound oxidoreductase in the ER. TMX exists in a predominantly reduced form and associates with the molecular chaperon calnexin, which can mediate substrate binding. To determine the target molecules for TMX, we apply a substrate-trapping approach based on the reaction mechanism of thiol-disulfide exchange, identifying major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain (HC) as a candidate substrate. Unlike the classical ER oxidoreductases such as protein disulfide isomerase and ERp57, TMX seems not to be essential for normal assembly of MHC class I molecules. However, we show that TMX-class I HC interaction is enhanced during tunicamycin-induced ER stress, and TMX prevents the ER-to-cytosol retrotranslocation of misfolded class I HC targeted for proteasomal degradation. These results suggest a specific role for TMX and its mechanism of action in redox-based ER quality control.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSE**

**LABORATORY OF INFECTION AND PREVENTION**

- Ahsan, M.K., Okuyama, H., Hoshino, Y., Oka, S., Masutani, H., Yodoi, J. and Nakamura, H. Thioredoxin-binding Protein-2 Deficiency Enhances Methionine-Choline Deficient Diet-induced Hepatic Steatosis but Inhibits Steatohepatitis in Mice. *Antioxid Redox Signal.* 11, 2573-84, 2009.
- Dansen, T.B., Smits, L.M., van, Triest, M.H., de, Keizer, P.L., van, Leenen, D., Koerkamp, M.G., Szypowska, A., Meppelink, A., Brenkman, A.B., Yodoi, J., Holstege, F.C. and Burgering, B.M. Redox-sensitive cysteines bridge p300/CBP-mediated acetylation and FoxO4 activity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 664-72, 2009.
- Fukunaga, A., Horikawa, T., Ogura, K., Taguchi, K., Xijun, Y., Funasaka, Y., Takeda, M., Nakamura, H., Yodoi, J. and Nishigori, C. Thioredoxin Suppresses the Contact Hypersensitivity Response by Inhibiting Leukocyte Recruitment during the Elicitation Phase.

Antioxid Redox Signal. 11, 1227-35, 2009.

- Hamada, Y., Fujii, H., Kitazawa, R., Yodoi, J., Kitazawa, S. and Fukagawa, M. Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-induced diabetic osteopenia: a novel role of oxidative stress and therapeutic implications. *Bone*. 44, 936-41, 2009.
- Hofer, S., Rosenhagen, C., Nakamura, H., Yodoi, J., Bopp, C., Zimmermann, J., Goebel, M., Schemmer, P., Hoffmann, K., Schlitz-Osthoff, K., Breitzkreutz, R. and Weigand, MA. Thioredoxin in human and experimental sepsis. *Crit Care Med*. 37, 2155-9, 2009.
- Kobayashi, N., Yamada, Y., Ito, W., Ueki, S., Kayaba, H., Nakamura, H., Yodoi, J. and Chihara, J. Thioredoxin reduces C-C chemokine-induced chemotaxis of human eosinophils. *Allergy*. 64, 1130-5, 2009.
- Masutani, H., Otsuki, R., Yamaguchi, Y., Takenaka, M., Kanoh, N., Takatera, K., Kunitomo, Y. and Yodoi, J. Fragrant Unsaturated Aldehydes Elicit Activation of the Keap1/ Nrf2 System Leading to the Up-regulation of Thioredoxin Expression and Protection against Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 11, 949-62, 2009.
- Matsuo, Y., Masutani, H., Son, A., Kizaka-Kondoh, S. and Yodoi, J. Physical and functional interaction of transmembrane thioredoxin-related protein with major histocompatibility complex class I heavy chain: redox-based protein quality control and its potential relevance to immune responses. *Mol Biol Cell*. 20, 4552-62, 2009.
- Mochizuki, M., Kwon, Y.W., Yodoi, J. and Masutani, H. Thioredoxin Regulates Cell Cycle via the ERK1/2-CyclinD1 Pathway. *Antioxid Redox Signal*. 11, 2957-71, 2009.
- Okuyama, H.\*, Yoshida, T.\*(\*equally contribution), Son, A., Oka, S., Wang, D., Nakayama, R., Masutani, H., Nakamura, H., Nabeshima, Y.I. and Yodoi, J. Thioredoxin binding protein 2 modulates natural killer T cell-dependent innate immunity in the liver: possible link to lipid metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 11, 2585-93, 2009.
- Son, A., Kato, N., Horibe, T., Matsuo, Y., Mochizuki, M., Mitsui, A., Kawakami, K., Nakamura, H. and Yodoi, J. Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF); Regulatory role of TRX on MIF internalization and signaling. *Antioxid Redox Signal*. 11, 2595-605, 2009.
- Zhang, J., Chen, F., Nakamura, T., Fujinaga, T., Aoyama, A., Hamakawa, H., Sakai, H., Hoshino, Y., Yodoi, J. and Wada, H. Protective effect of thioredoxin perfusion but not inhalation in warm ischemic-reperfused rat lungs. *Redox Rep*. 14, 75-81, 2009.
- Zhou, F., Gomi, M., Fujimoto, M., Hayase, M., Marumo, T., Masutani, H., Yodoi, J., Hashimoto, N., Nozaki, K. and Takagi, Y. Attenuation of neuronal degeneration in thioredoxin-1 overexpressing mice after mild focal ischemia. *Brain Res*. 26, 62-70, 2009.
- Nakamura, H., Hoshino, Y., Okuyama, H., Matsuo, Y. and Yodoi, J. Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 61, 303-9, 2009.
- 榮長裕晴、吉原栄治、松尾禎之、淀井淳司：酸化ストレスとレドックス制御～タンパク質

の酸化的修飾と活性調整～ 生物試料分析 第32巻 第4号 pp265-272 2009.  
正木聡、中村肇、淀井淳司：酸化ストレス関連マーカー ペルオキシレドキシン 日本  
臨牀増刊号 第67巻 第968号 pp591-594 2009.  
増谷弘：チオレドキシンによる酸化ストレス防御とレドックスシグナル制御 実験医学  
増刊号 第27巻 第15号 pp124-128 2009.  
吉原栄治、淀井淳司：メタボリックストレスとレドックス制御 医学のあゆみ 第22  
9巻 第3号 pp223 2009.  
渡辺理江、淀井淳司：活性酸素種 (ROS) 日本臨牀増刊号 第67巻 第968号  
pp577-580 2009.

---

Zhe Chen、Dorys Adriana Lopez、吉原栄治、前田道之、杉江勝治、淀井淳司：Glucocorticoid sensitivity, mediated through thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP-1/TXNIP), changes during the transformation by HTLV-1 : TBP-2 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia treatment. 第2回 HTLV-1 研究会合同班会議、東京、2009年8月29日—30日  
Zhe Chen、前田道之、杉江勝治、淀井淳司：Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) mediates glucocorticoid-induced growth inhibition of HTLV-1 transformed ATL cell lines. 第39回  
日本免疫学会、大阪、2009年12月4日  
Zhe Chen、Dorys Adriana Lopez、吉原栄治、前田道之、杉江勝治、淀井淳司：Loss of Glucocorticoid sensitivity, mediated through thioredoxin binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP), during T cell transformation by HTLV-1: TBP-2 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia. 第32回分子生物学会、横浜、2009年12月10日  
孫安生、松尾禎之、堀部智久、川上浩二、中村肇、淀井淳司：Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF); Regulatory role TRX on MIF internalization and signaling. 第32回分子生物学会、横浜、2009年12月11日  
増谷弘：Thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) Txnip in oncology and metabolism. SFRR international Free Radical School in Japan Sep 2-6, 2009, Joetus.  
望月芳香、Kwon YW、淀井淳司、増谷弘：Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-Cyclin D1 pathway. 5<sup>th</sup> Joint meeting of the societies for free radical research Australasia and Japan, Dec 1-4, 2009, Sydney Australia.  
松尾禎之、増谷弘、淀井淳司：Physical and functional interaction of transmembrane thioredoxin-related protein (TMX) with MHC class I heavy chain. 第82回日本生化学会大会 シンポジウム《タンパク質品質管理とレドックス制御》、神戸、2009年10月22日  
吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、淀井淳司、増谷弘：Thioredoxin binding protein-2/Txnip is a key regulatory molecule in insulin resistance and type 2 diabetes. 第32回分子生物学会、横浜、2009年12月10日  
吉原栄治、藤本新平、稲垣暢也、淀井淳司、増谷弘：Thioredoxin binding protein-2 is a key

regulator of mitochondrial energy production and membrane potential. Keystone symposia, Cell death pathways, March 22-27, 2009, Whistler, Canada.

淀井淳司：酸化ストレスと免疫・アレルギー疾患；チオレドキシンの役割 第32回シスメックス学術セミナー、神戸、2009年6月13日

淀井淳司：ストレスシグナルのレドックス制御：共棲・環境・炎症 京都大学ウイルス研究所学術講演会、京都、2009年7月10日

淀井淳司：アレルギー性炎症のレドックス制御；チオレドキシンの標的分子 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 教育講演、秋田、2009年10月29日

**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**  
**LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS**

- 1) **Genome-wide screening of the kinases required for the control of cell division axis:**  
**S. MATSUMURA, M. HAMASAKI, M. EBISUYA<sup>1</sup>, T. YAMAMOTO<sup>2</sup>, E. NISHIDA<sup>3</sup>**  
**and F. TOYOSHIMA** (<sup>1</sup>ICDO, Career-Path Promotion Unit, Kyoto University, <sup>2</sup>iCeMS,  
Kyoto University, <sup>3</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Proper spindle orientation, which is crucial for the determination of cell division axis, plays an essential role in the determination of cell fate and tissues architecture. Despite the proposal that it has an important function in tissue organization in mammals, the mechanisms regulating spindle orientation have been little studied outside of the invertebrates *S. cerevisiae*, *C. elegans* and *Drosophila*. We have previously shown that in non-polarized cultured adherent cells, the  $\beta 1$  integrin-mediated cell-ECM adhesion orients the mitotic spindles along the axis parallel to the place of cell-ECM adhesion, which allows the cells to divide parallel to the substratum. A recent report has revealed that  $\beta 1$  integrin plays an important role for the determination of the spindle orientation in the basal epidermal cells of mouse skin. However, the molecular mechanisms for the integrin-dependent spindle orientation control are largely unknown. We performed a genome-wide screening of kinases required for the spindle orientation in HeLa cells by using the siRNA library which covers 719 human kinases and kinase-related genes. In the first screening, we scored the spindle orientation of each metaphase cell in a 3-point scale and identified 31 genes as candidates. Then, 31 genes were subjected to the 2nd screening. In the 2nd screening, to quantify the spindle orientation, we measured the angle between the axis of the spindle and that of substratum in metaphase cells. We newly developed an image analyzing software, which automatically detects two poles of mitotic spindles from a series of Z stack images and calculate the spindle angle. We identified 5 genes that are required for the proper spindle orientation in HeLa cells. Inhibition of one of the kinases by the specific chemical inhibitors results in the spindle misorientation in both HeLa cells and in the epithelial cells in the mouse skin, suggesting that this kinase plays an essential role in the spindle orientation not only in the cultured cells but also in the mouse epithelium.

- 2) **Roles of cholesterol in the progression of mitosis: M. HAMASAKI and F. TOYOSHIMA**

The plasma membranes of mammalian cells composed of many kinds of lipids, including phospholipids, sphingolipids and cholesterol. We have previously shown that phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>)- plays an essential role in the control of spindle orientation during mitosis in HeLa cells. In this year, we have been investigating the roles of



cholesterol in the progression of mitosis. We have found that depletion of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin, results in the increases of the proportion of the mitotic cells with multipolar spindles. Moreover, knockdown of squalene synthase, an enzyme essential for the de-novo synthesis of cholesterol, and/ or LDL receptors, also induced multipolar spindles. These results suggest that the cholesterol and/or its metabolites regulate the spindle formation during mitosis.

**3) Regulation of the integrin traffic by mitotic regulators: K. IKAWA, S. MATSUMURA, M. FUKUDA<sup>1</sup> and F. TOYOSHIMA** (<sup>1</sup>Department of Developmental Biology and Neurosciences, Tohoku University)

Integrins, which are the major cell surface adhesion receptors for ligands in the extracellular matrix, are internalized by endocytosis and recycled to cell surface through recycling endosomes. This integrin traffic is important for cell migration and cancer cell invasion. However, the molecular mechanisms for the integrin traffic are poorly understood. We have found that a kinase, which is well known as a mitotic regulator, controls the integrin traffic. Treatments of HeLa cells with the inhibitor for this kinase cause the enlargement of the integrin-signal dots within the cells. Moreover, knockdown of the kinase by siRNA results in the changes in the shape of the integrin-containing vesicles, which can be discerned by allowing the cells to internalize the antibodies against  $\beta$ 1-integrins. We are now investigating how the kinase regulates the integrin traffic and whether it is involved in the cell migration.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**

**LABORATORY OF SUBCELLULAR BIOGENESIS**

Mitsushima, M., Toyoshima, F. and Nishida, E. Dual role of Cdc42 in spindleorientation control in adherent cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2816-2827, 2009.

---

松村繁、濱崎眞弓、戎家美紀、山本拓也、西田栄介、豊島文子：c-Abl チロシンキナーゼによるマウス胎仔の皮膚基底層における細胞分裂軸の制御機構。第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日

井川敬介、松村繁、福田光則、豊島文子：Polo-like kinase によるインテグリン Trafficking の制御。第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24 日

松村繁、濱崎眞弓、戎家美紀、山本拓也、西田栄介、豊島文子：c-Abl チロシンキナーゼによる細胞分裂軸の制御機構。第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日

## **DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**

### **LABORATORY OF GROWTH REGULATION**

The research interest of this laboratory is to understand the molecular mechanism of cell differentiation and organogenesis. Particularly, we are interested in basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that regulate developmental processes such as neural development and somite formation. We are characterizing the functions of bHLH genes by misexpressing the genes with retrovirus and electroporation (gain-of-function study) and by generating knock-out mice (loss-of-function study). During neural development, the following steps occur sequentially: (1) maintenance of neural stem cells, (2) neurogenesis and (3) gliogenesis. Our results indicate that all three steps are regulated by bHLH genes. bHLH genes such as Hes1 and Hes5 regulate maintenance of neural stem cells and promotion of gliogenesis, while bHLH genes such as Mash1 and Math3 regulate specification of the neuronal fate. During somite formation, the bHLH genes Hes1 and Hes7 display oscillatory expression with periodicity of about two hours and regulate the timing of somite segmentation. By making and evaluating mathematical modeling, we are now studying how the dynamics of gene expression are controlled during somite formation.

Interestingly, oscillating gene expression is not unique to the somite formation but is widely observed in many other processes. We found that Hes1 expression oscillates with a period of about 2-3 hours in neural progenitor cells, and that Hes1 oscillation is important for activation of Notch signaling between these cells. We also found that Hes1 expression oscillates with a period of about 3-5 hours in embryonic stem (ES) cells, and that Hes1 oscillation contributes to heterogeneous responses of these cells. In both neural progenitor cells and ES cells, the period and amplitude of Hes1 oscillation are variable from cell to cell and from cycle to cycle, suggesting that Hes1 oscillation is important to make heterogeneity among cells rather than to function as a biological clock.

#### **1) The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells: T. KOBAYASHI, H. MIZUNO, I. IMAYOSHI, C. FURUSAWA, K. SHIRAHIGE and R. KAGEYAMA**

Stem cells do not all respond the same way, but the mechanisms underlying this heterogeneity are not well understood. Here, we found that expression of Hes1 and its downstream genes oscillate in mouse embryonic stem (ES) cells. Those expressing low and high levels of Hes1 tended to differentiate into neural and mesodermal cells, respectively. Furthermore, inactivation of Hes1 facilitated neural differentiation more uniformly at earlier time. Thus, Hes1-null ES cells display less heterogeneity in both the differentiation timing and fate choice, suggesting that the cyclic gene Hes1 contributes to heterogeneous responses of ES cells even under the same

environmental conditions.

**2) Hopf Bifurcation in the Presomitic Mesoderm during the Mouse Segmentation: A. GONZALEZ and R. KAGEYAMA**

Vertebrae and ribs arise from embryonic tissues called somites. Somites arise sequentially from the unsegmented embryo tail, called presomitic mesoderm (PSM). The pace of somite formation is controlled by gene products such as hairy and enhancer of split 7 (Hes7) whose expression oscillates in the PSM. In addition to the cyclic genes, there is a gradient of fibroblast growth factor 8 (Fgf8) mRNA from posterior to anterior PSM. Recent experiments have shown that in the absence of Fgf signaling, Hes7 oscillations in the anterior and posterior PSM are lost. On the other hand, Notch mutants reduce the amplitude of posterior Hes7 oscillations and abolish anterior Hes7 oscillations. To understand these phenotypes, we delineated and simulated a logical and a delay differential equation (DDE) model with similar network topology in wild-type and mutant situations. Both models reproduced most wild-type and mutant phenotypes suggesting that the chosen topology is robust to explain these phenotypes. Numerical continuation of the model showed that even in the wild-type situation, the system changed from sustained to damped, i.e. a Hopf bifurcation occurred, when the Fgf concentration decreased in the PSM. This numerical continuation analysis further indicated that the most sensitive parameters for the oscillations are the parameters of Hes7 followed by those of Lunatic fringe (Lfng) and Notch1. In the wild-type, the damping of Hes7 oscillations was not so strong so that cells reached the new somites before they lose Hes7 oscillations. By contrast, in the fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1) conditional knock-out (cKO) mutant simulation, Notch signaling was not able to maintain sustained Hes7 oscillations. Our analysis suggests that Fgf signaling makes cells enter an oscillatory state of Hes7 expression. After moving to the anterior PSM, where Fgf signaling is missing, Notch signaling compensates the damping of Hes7 oscillations in the anterior PSM.

**3) Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity: D.S.WALL, A.J. MEARS, B. MCNEILL, C. MAZEROLLE, S. THURIG, Y. WANG, R. KAGEYAMA and V.A. WALLACE**

Sonic hedgehog (Shh) is an indispensable, extrinsic cue that regulates progenitor and stem cell behavior in the developing and adult mammalian central nervous system. Here, we investigate the link between the Shh signaling pathway and Hes1, a classical Notch target. We show that Shh-driven stabilization of Hes1 is independent of Notch signaling and requires the Shh effector Gli2. We identify Gli2 as a primary mediator of this response by showing that Gli2 is required for Hh (Hedgehog)-dependent up-regulation of Hes1. We also show using chromatin

immunoprecipitation that Gli2 binds to the Hes1 promoter, which suggests that Hes1 is a Hh-dependent direct target of Gli2 signaling. Finally, we show that Shh stimulation of progenitor proliferation and cell diversification requires Gli2 and Hes1 activity. This paper is the first demonstration of the mechanistic and functional link between Shh, Gli, and Hes1 in the regulation of progenitor cell behavior.

**4) Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27Kip1: J. MURATA, T. OHTSUKA, A. TOKUNAGA, S. NISHIIKE, H. INOHARA, H. OKANO and R. KAGEYAMA**

The Notch signaling pathway has a crucial role in the differentiation of hair cells and supporting cells by mediating "lateral inhibition" via the ligands Delta-like1 (Dll1) and Jagged2 (Jag2) and the effectors Hes1 and Hes5 during mammalian inner ear development. Recently, another Notch ligand, Jagged1 (Jag1)-dependent Notch activation, has been revealed to be important for the determination of the prosensory region in the earlier stage before cell differentiation. However, little is known about the effectors of the Notch pathway in this context. P27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, is also known to demarcate the prosensory region in the cochlear primordium, which consists of the sensory progenitors that have completed their terminal mitoses. Hes1 reportedly promotes precursor cell proliferation through the transcriptional down-regulation of p27(Kip1) in the thymus, liver, and brain. In this study, we observed Hes1 as a mediator between the Notch signaling pathway and the regulation of proliferation of sensory precursor cells by p27(Kip1) in the developing cochlea. We showed that Hes1, but not Hes5, was weakly expressed at the time of onset of p27(Kip1). The expression pattern of Hes1 prior to cell differentiation was similar to that of activated Notch1. P27(Kip1) was up-regulated and BrdU-positive S-phase cells were reduced in the developing cochlear epithelium of Hes1 null mice. These results suggest that the Notch-Hes1 pathway may contribute to the adequate proliferation of sensory precursor cells via the potential transcriptional down-regulation of p27(Kip1) expression and play a pivotal role in the correct prosensory determination.

**5) The first Hes1 dimer inhibitors from natural products: M.A. ARAI, A. MASADA, T. OHTSUKA, R. KAGEYAMA and M. ISHIBASHI**

In the present study, we developed a high-throughput screening system for small molecule-inhibitors of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional repressor factor Hes1. Successful dimerization of Hes1 immobilized on a microplate and fluorophore (Cy3)-labelled Hes1

was confirmed. Using this system, several natural products were identified as the first Hes1 dimer inhibitors. Of these, two compounds which were isolated from myxomycetes (true slime molds) inhibited Hes1 from N box-dependent suppression of the gene expression in C3H10T1/2 cells.

**6) Spatiotemporal pattern in somitogenesis: a non-Turing scenario with wave propagation: H. NAGAHARA, Y. MA, Y. TAKENAKA, R. KAGEYAMA and K. YOSHIKAWA**

Living organisms maintain their lives under far-from-equilibrium conditions by creating a rich variety of spatiotemporal structures in a self-organized manner, such as temporal rhythms, switching phenomena, and development of the body. In this paper, we focus on the dynamical process of morphogens in somitogenesis in mice where propagation of the gene expression level plays an essential role in creating the spatially periodic patterns of the vertebral columns. We present a simple discrete reaction-diffusion model which includes neighboring interaction through an activator, but not diffusion of an inhibitor. We can produce stationary periodic patterns by introducing the effect of spatial discreteness to the field. Based on the present model, we discuss the underlying physical principles that are independent of the details of biomolecular reactions. We also discuss the framework of spatial discreteness based on the reaction-diffusion model in relation to a cellular array, by comparison with an actual experimental observation.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY**

**LABORATORY OF GROWTH REGULATION**

- Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes & Dev.* 23, 1870-1875.
- Gonzalez, A., and Kageyama, R. (2009) Hopf Bifurcation in the Presomitic Mesoderm during the Mouse Segmentation. *J. Theor. Biol.* 259, 176-189.
- Wall, D.S., Mears, A.J., McNeill, B., Mazerolle, C., Thurig, S., Wang, Y., Kageyama, R., and Wallace, V.A. (2009) Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. *J. Cell Biol.* 184, 101-112.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2009) Continuous neurogenesis in the adult brain. *Dev. Growth Diff.* 51, 379-386.
- Kageyama, R., Niwa, Y., and Shimojo, H. (2009) Rhythmic gene expression in somite formation and neural development. *Mol. Cells* 27, 497-502.
- Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2009) Dynamic advances in NF- $\kappa$ B signaling analysis. *Science*

Signaling 2, pe47.

- Nagahara, H., Ma, Y., Takenaka, Y., Kageyama, R., and Yoshikawa, K. (2009) Spatio-temporal pattern in somitogenesis: a non-Turing scenario with wave propagation. *Physical Rev. E.* 80, 0219106(1-7).
- Murata, J., Ohtsuka, T., Tokunaga, A., Nishiike, S., Inohara, H., Okano, H., and Kageyama, R. (2009) Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27(Kip1). *J. Neurosci. Res.* 87, 3521-3534.
- Arai, M., Masada, A., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Ishibashi, M. (2009) The first Hes1 dimer inhibitors from natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 5778-5781.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2009) Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 733-740.
- Niwa, Y., Shimojo, H., and Kageyama, R. (2009) Ultradian oscillation networks in somite segmentation and other biological events. In *Systems Biology* (Eds, S. Nakanishi, R. Kageyama, and D. Watanabe) Springer, pp. 199-207.
- Kageyama, R., Ohsawa, R., and Ohtsuka, T. (2009) Cell differentiation. In *Encyclopedia of Neuroscience* (Eds. M.D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst) Academic Press, Oxford, pp. 591-596.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Ohsawa, R., and Hatakeyama, J. (2009). Helix-loop-helix (bHLH) proteins: Hes family. In *Encyclopedia of Neuroscience* (Ed. L.R. Squire). Academic Press, Oxford. vol. 4, pp. 1057-1065.

影山龍一郎：神経幹細胞とニューロン新生. *Zenis*、創刊号: 74. 2009.

今吉格、坂本雅行、影山龍一郎：成体脳ニューロン新生と高次脳機能. *Medical Bio*, 3: 25-28. 2009.

- 
- Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. 8<sup>th</sup> International Conference on Information Processing in Cells and Tissues, Ascona, Switzerland, April 5-9, 2009.
- Kageyama, R.: The role of Hes1 in proliferation and differentiation of neural stem cells. EMBO Workshop/ 5<sup>th</sup> International Symposium on bHLH transcription factors. London, UK, May 7-8, 2009.
- Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. Symposium on Developmental Biology, London, UK, June 17-19, 2009.
- Kageyama, R.: The role of Hes1 oscillations in regulation of stem/progenitor cells. The Notch Meeting. Athens, Greece, Sept 27-Oct 1, 2009.
- Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. The 16<sup>th</sup>

East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Kyoto, Sept 13-14, 2009.

Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. Construction and Reconstruction of the Brain. Awaji, 2009.

Kageyama, R.: The significance and mechanism of adult neurogenesis. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2009.

Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. Joint Congress of the 6<sup>th</sup> Congress of Asian Sleep Research Society, the 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research, and the 16<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Chronobiology. Osaka, 2009.

Imayoshi, I.: Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. Keystone Symposium "Chemical senses: receptors and circuits". USA, March 15-19, 2009.

Niwa, Y., Miyachi, H., and Kageyama, R.: Coupled oscillations in Notch and Fgf signaling underlie the coordination of the segmentation clock and the wavefront for periodic somite formation. International Societies for Developmental Biologists Congress, UK, Sept 6-10, 2009.

影山龍一郎：分節時計の数理モデルの構築と実験的検証。第 114 回日本解剖学会総会、岡山、2009。

影山龍一郎：神経幹細胞とニューロン新生。第 9 回日本分子生物学会春季シンポジウム、宮崎、2009。

影山龍一郎：The role of Hes genes in embryonic and adult neural stem cells. 第 42 回日本発生生物学会大会、新潟、2009。

影山龍一郎：成体脳における神経幹細胞とニューロン新生。第 1 回産学情報交流会、京都、2009。

影山龍一郎：2 時間を刻む生物時計と生命現象。第 14 回睡眠科学研究講座、大阪、2009。

影山龍一郎：成体脳の神経幹細胞とニューロン新生。第 29 回北野病院研究所セミナー、大阪、2009。

Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Ito, J., and Kageyama, R.: Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 名古屋、2009。

Tan, S.L., Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning Hes1 expression in the developing cortex. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009。

Imayoshi, I., and Kageyama, R.: Roles of Notch signaling in adult neural stem cells. Construction and Reconstruction of the Brain. 淡路、2009。

Tan, S.L., and Kageyama, R.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning Hes1 expression in the developing cortex. Construction and Reconstruction of

the Brain. 淡路、2009.

Tan, S.L., and Kageyama, R.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning Hes1 expression in the developing cortex. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009.

Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.

Imayoshi, I.: Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE, Osaka, Jan 31-Feb 1, 2009.

Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R.: The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.



**INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH  
LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION**

- 1) Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for companion animals: R. YOSHIKAWA, M. OKADA, M. GOLDER<sup>1</sup>, H. STEWART<sup>1</sup>, M. PALMARINI<sup>1</sup> and T. MIYAZAWA (<sup>1</sup>Institute for Comparative Medicine, University of Glasgow)**

The genomes of all animal species are colonized by endogenous retroviruses (ERVs). Although most ERVs have accumulated defects that render them incapable of replication, fully infectious ERVs have been identified in various mammals. In this study, we isolated a feline infectious ERV (RD-114 virus) in a proportion of live attenuated vaccines for companion animals. Isolation of RD-114 was made in two independent laboratories using different detection strategies and using vaccines for both cats and dogs commercially available in Japan or the United Kingdom. This study shows that the methods currently employed to screen veterinary vaccines for retroviruses should be re-evaluated.

- 2) Focus assay on FeLIX-dependent feline leukemia virus: Y. NAKAYA, T. SHOJIMA, S. HOSHINO and T. MIYAZAWA**

T-lymphotropic feline leukemia virus (FeLV-T) induces immunodeficiency in cats. FeLV-T is fusion-defective and requires a cofactor, termed FeLIX, for infection. FeLIX is a truncated envelope glycoprotein of an endogenous FeLV and mediates infection by binding a phosphate transporter Pit-1. In this study, we established a feline sarcoma-positive leukemia-negative cell line expressing FeLIX, named QN/FeLIX cells. Upon infection, FeLV-T induced prominent foci with syncytia in QN/FeLIX cells and could be titrated by the focus assay. In addition, we established a FeLIX-expressing feline fibroblast cell line, named AH/FeLIX cells. FeLV-T productively infected AH/FeLIX cells and induced severe CPE with syncytia. QN/FeLIX and AH/FeLIX cells will be useful for the study of FeLIX-dependent mutants in FeLV-infected cats.

- 3) Epigenetical characterization of Human porcine endogenous retrovirus receptor 2 in placenta: Y. NAKAYA and T. MIYAZAWA**

Xenotransplantation from pig to human is a promising way to overcome the shortage of human organs in transplantation. However, xenotransplantation has been banned due to the existence of porcine endogenous retroviruses (PERVs). Although proviruses of PERVs are present in the porcine genomic DNA, almost all of them are defective due to mutations and/or

deletions, except for several infectious copies of PERV-A, -B, and -C. Both PERV-A and -B infect human cells in vitro, and human PERV-A receptors (HuPAR-1 and -2) have been identified. PERV-A can utilize HuPAR-2 more efficiently than HuPAR-1 in infection. *HuPAR-1* is ubiquitously expressed in most tissues; however *HuPAR-2* is specifically highly expressed in placenta. To investigate the mechanisms of differential expression of HuPARs is important to regulate PERV-A infection. In the present study, we analyzed transcriptional mechanisms of *HuPAR-2* in placental tissue focusing on epigenetic feature. Firstly, we identified a CpG island (-308 to +139) around the transcription start site (TSS, +1) of *HuPAR-2*. This region was in a hypomethylated status in placenta (13%) compared with testes (59%), kidney (33%), BeWo cells (79%), and HEK293 cells (83%) where *HuPAR-2* expression was low. Luciferase assay revealed that the region containing the CpG island has a promoter activity, but the activity was suppressed by *in vitro* methylation. Additionally, treatment with a DNA methyltransferase inhibitor increased the *HuPAR-2* expression in HEK293 cells. Chromatin-immunoprecipitation assay indicated that H3K4-trimethylation, that is indicator of euchromatin, was often detected in placenta, on the contrary H3K9-trimethylation, a marker of heterochromatin, was significantly abounding in HEK293 cells and BeWo cells. These data suggest that the epigenetical modification of the CpG island in the vicinity of *HuPAR-2* TSS might be a pivotal role in regulation of transcriptional activity of *HuPAR-2*.

## LIST OF PUBLICATIONS

### DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY

### LABORATORY OF SIGNAL TRANSDUCTION

Sato, K., Yamamoto, S. P., Misawa, N., Yoshida, T., Miyazawa, T., and Koyanagi, Y. 2009. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin for HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology* 6: e53.

Nakaya, Y., Shojima, T., Yasuda, J., and Miyazawa, T. 2010. Unusual permeability of porcine endogenous retrovirus subgroup A through membrane filters. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 67-71.

Nakaya, Y., Shojima, T., Hoshino, S., and Miyazawa, T. 2010. Focus assay on FeLIX-dependent feline leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 117-121.

宮沢孝幸 2009 動物由来レトロウイルスの受容体 ウイルス (Virus) 59: 223-224.

---

### 【学会発表等】

宮沢孝幸、仲屋友喜、吉川禄助 感染リスク要因としての内在性レトロウイルス 第 147 回日本獣医学会学術集会 (栃木) (招待講演) (2009 年 4 月 2 日 - 4 日)

吉川禄助、庄嶋貴之、馬場健司、仲屋友喜、宮沢孝幸 イヌ用弱毒生ワクチンにおける RD114

ウイルスの迷入 第 147 回日本獣医学会学術集会 (栃木) (2009 年 4 月 2 日 - 4 月 4 日)

庄嶋貴之、大畑拓司、宮沢孝幸 内在化しつつあるレトロウイルス: コアラレトロウイルス 第 147 回日本獣医学会学術集会 (栃木) (招待講演) (2009 年 4 月 2 日 - 4 月 4 日)

仲屋友喜、庄嶋貴之、宮沢孝幸 ブタ内在性レトロウイルスの感染能の不安定性 第 147 回日本獣医学会学術集会 (栃木) (2009 年 4 月 2 日 - 4 月 4 日)

大畑拓司、庄嶋貴之、馬場健司、宮沢孝幸 日本の動物園コアラにおけるコアラレトロウイルスの感染状況調査 第 147 回日本獣医学会学術集会 (栃木) (2009 年 4 月 2 日 - 4 月 4 日)

Fukuma, A., Miyazawa, T., and Yasuda, J.: Cellular and viral requirements for budding of feline endogenous retrovirus. Cold Spring Harbour Laboratory Meeting "Retroviruses", Cold Spring Harbour, New York, USA. (18-23 May 2009)

Yoshikawa, R., Okada, M., Shojima, T., and Miyazawa, T.: Potential risk of endogenous retrovirus infection by vaccination in companion animals. Cold Spring Harbour Laboratory Meeting "Retroviruses", Cold Spring Harbour, New York, USA. (18-23 May 2009)

Furuta, R., Miyazawa, T., Sugiyama, T., Kimura, T., Hirayama, F., Tani, Y., Shibata, H.: The prevalence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in healthy blood donors in Japan. Cold Spring Harbour Laboratory Meeting "Retroviruses", Cold Spring Harbour, New York, USA. (18-23 May 2009)

宮沢孝幸 ウイルスも身の内: レトロウイルスの生態 京都大学ウイルス研究所学術講演会 (招待講演) (2009 年 7 月 10 日)

宮沢孝幸 内在性レトロウイルスの功罪 第 12 回日本レトロウイルス研究会 (栃木) (招待講演) (2009 年 8 月 27 日 - 8 月 29 日)

星野重樹 新規コアラ内在性レトロウイルスの同定 第 12 回日本レトロウイルス研究会 (栃木) (2009 年 8 月 27 日 - 8 月 29 日)

Hoshino, S., Ohata, T., Shojima, T., and Miyazawa, T.: Identification of a novel koala endogenous retrovirus. The 16th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Kyoto. (12-15 September 2009)

Baba, K., Shojima, T., and Miyazawa, T.: Identification of new bovine endogenous retrovirus envelopes and putative accessory proteins. 21st Retroviral Pathogenesis Workshop, Lucca, Italy. (13-17 September 2009)

Nakaya, Y., and Miyazawa, T.: Epigenetic characterization of human porcine endogenous retrovirus receptor 2 in placenta. 21st Retroviral Pathogenesis Workshop, Lucca, Italy. (13-17 September 2009)

Shojima, T., Ohata, T., Hoshino, S., and Miyazawa, T.: Identification and characterization of a novel subtype of koala retrovirus. 21st Retroviral Pathogenesis Workshop, Lucca, Italy.

(13-17 September 2009)

Yoshikawa, R., Okada, M., Shojima, T., and Miyazawa, T.: Contamination of replication-competent RD-114 virus in live attenuated vaccines for dogs. 21st Retroviral Pathogenesis Workshop, Lucca, Italy. (13-17 September 2009)

吉川禄助、馬場健司、仲屋友喜、宮沢孝幸 CRFK 細胞由来 RD114 ウイルスの遺伝子解析  
第 148 回日本獣医学会学術集会（鳥取）（2009 年 9 月 25 日 - 9 月 27 日）

大畑拓司、庄嶋貴之、星野重樹、馬場健司、宮沢孝幸 南方系コアラにおけるコアラレトロウイルスの解析 第 148 回日本獣医学会学術集会（鳥取）（2009 年 9 月 25 日 - 9 月 27 日）

仲屋友喜、宮沢孝幸 転写因子 AP-2 によるヒトブタ内在性レトロウイルスサブタイプ A 受容体 2 の発現制御 第 148 回日本獣医学会学術集会（鳥取）（2009 年 9 月 25 日 - 9 月 27 日）

星野重樹、大畑拓司、庄嶋貴之、宮沢孝幸 南方系コアラにおける新規内在性コアラレトロウイルスの同定 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）（2009 年 10 月 25 日 - 10 月 27 日）

阿部真澄、福岡藍子、宮沢孝幸、安田二郎 ブタ内在性レトロウイルス（PERV）の出芽解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）（2009 年 10 月 25 日 - 10 月 27 日）

仲屋友喜、宮沢孝幸 ヒトブタ内在性レトロウイルスサブタイプ A 受容体 2 のエピジェネティックスによる転写制御 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）（2009 年 10 月 25 日 - 10 月 27 日）

吉川禄助、仲屋友喜、馬場健司、宮沢孝幸 イヌ用弱毒生ワクチンへのネコ内在性レトロウイルスの迷入 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）（2009 年 10 月 25 日 - 10 月 27 日）

福岡藍子、阿部真澄、森川裕子、宮沢孝幸、安田二郎 ネコ内在性レトロウイルスの出芽機構の解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）（2009 年 10 月 25 日 - 10 月 27 日）

Miyazawa, T., and Yoshikawa, R.: Presence of an infectious endogenous retrovirus in live attenuated vaccines for companion animals. Viral safety and Extraneous Agents Testing for Veterinary Vaccines, where? (25-27 October 2009)

## **RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS**

A long standing goal of our research group is to elucidate the molecular mechanisms of virus pathogenesis. We have been focusing on two human viruses, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1).

### **1) Molecular Analysis on Interaction of HIV-1 and Host Factors: K. SATO, T. KOBAYASHI, Y. SHINODA, T. WATANABE, S. YAMAMOTO, P. GEE, N. MISAWA, H. EBINA and Y. KOYANAGI**

To accomplish efficient release of HIV-1 particles, HIV-1 Vpu is required in certain cells (e.g., HeLa cells) but is dispensable in other cell types. A previous report suggested that an inhibitory factor(s) for HIV-1 release is expressed in HeLa cells and the effect is attenuated by Vpu. Recently, Neil and colleagues identified the inhibitor, human BST-2 (also called CD317 or HM1.24), in HeLa cells, and referred to this protein as "Tetherin". They also showed that the inhibitory action of BST-2 on HIV-1 particle release was antagonized by Vpu. However, the molecular mechanism(s) for tethering HIV-1 particles by BST-2 remains unclear, and we speculated about the requirement for cellular co-factor(s) to trigger or assist its tethering ability. To explore this possibility, we utilize several cell lines derived from various species including human, AGM, dog, cat, rabbit, pig, mink, potoroo, and quail. We found that ectopic BST-2 was efficiently expressed on the surface of all analyzed cells, and its expression suppressed the release of viral particles in a dose-dependent manner. These findings suggest that BST-2 can tether HIV-1 particles without the need of additional co-factor(s) that may be expressed exclusively in primates, and thus, BST-2 can also exert its function in many cells derived from a broad range of species. Interestingly, the suppressive effect of BST-2 on HIV-1 release in Vero cells was much less pronounced than in the other examined cells despite the augmented surface expression of ectopic BST-2 on Vero cells. Collectively, our findings suggest the existence of certain cell types in which BST-2 cannot efficiently exert its inhibitory effect on virus release. The cell type-specific effect of BST-2 may be critical to elucidate the mechanism of BST-2-dependent suppression of virus release.

Changing cellular protein trafficking may represent a novel antiviral approach. We have discovered that an N-terminal deletion mutant of a membrane protein CD63, CD63 $\Delta$ N, blocks entry of CXCR4-tropic HIV-1 by suppressing CXCR4 surface expression. This suppression was observed in CXCR4 but not in CD4, CCR5, CD25, CD71, or other tetraspanin proteins. From a series of extensive analyses including confocal and total internal reflection fluorescence microscopy examination, the suppression of CXCR4 expression on the plasma membrane appeared to be caused by mislocalization of CXCR4 and exclusive transportation of CXCR4 toward intracellular

organelles mainly the late endosomes/lysosomes through interaction with CD63ΔN. We next found that the mislocalization and interaction were clearly attenuated by alternation of all three *N*-linked glycosylation sites in CD63. Either full-length CD63 or CD63ΔN formed a complex with CXCR4 at the Golgi apparatus and the late endosomes, while CD63 *N*-linked glycans-deficient form mutants lost the ability to form a complex with CXCR4 exclusively at the Golgi apparatus, suggesting that CD63 interacts with CXCR4 through *N*-linked glycans-portion of CD63 protein and the complex induces direction of CXCR4 trafficking to the endosomes/lysosomes, not to the plasma membrane. At the Golgi apparatus, there may be lysosome protein (CD63)-associated machinery that influences trafficking of other membrane proteins.

We are also attempting to identify HIV-associated host factors using a variety of genetics- and protein chemistry-based methods. Candidates of the HIV-associated host factor under investigation are cytokines, signal molecules, and membrane proteins.

## **2) HIV Pathogenesis: K. SATO, N. MISAWA, T. KOBAYASHI and Y. KOYANAGI**

Studies on HIV-1 infection in a small animal model that can support both long-term *de novo* human hematopoiesis and long-term systemic HIV-1 infection can greatly contribute to the understanding on HIV-1 pathogenesis. We generated NOG-hCD34 mice by transplanting newborn NOD/SCID/IL2R $\gamma^{\text{null}}$  mice with hCD34 $^{+}$  cells via hepatic injection. The longitudinal flow cytometric analyses showed that NOG-hCD34 mice were able to support human hematopoiesis and multilineage differentiation of human leukocytes for at least 44 wks. To investigate the events leading to the depletion of CD4 $^{+}$  T lymphocytes during long-term infection of HIV-1, we infected NOG-hCD34 mice with CXCR4-tropic and CCR5-tropic HIV-1. CXCR4-tropic HIV-1-infected mice were quickly depleted of CD4 $^{+}$  thymocytes and both CD45RA $^{+}$  naïve and CD45RA $^{-}$  memory CD4 $^{+}$  T lymphocytes, while CCR5-tropic HIV-1-infected mice were preferentially depleted of CD45RA $^{-}$  memory CD4 $^{+}$  T lymphocytes. Staining of HIV-1 p24 antigen revealed that CCR5-tropic HIV-1 preferentially infected effector memory T lymphocytes (T<sub>EM</sub>) rather than central memory T lymphocytes. In addition, the majority of p24 $^{+}$  cells in CCR5-tropic HIV-1-infected mice were activated and in cycling phase. Taken together, our findings indicate that productive infection mainly takes place in the activated T<sub>EM</sub> in cycling phase and further suggest that the predominant infection in T<sub>EM</sub> would lead to the depletion of memory CD4 $^{+}$  T lymphocytes in CCR5-tropic HIV-1-infected mice. This is the first report addressing the mechanisms and dynamics of HIV-1-induced CD4 $^{+}$  T lymphocyte depletion *in vivo*. We report the selective depletion of memory CD4 $^{+}$  T lymphocytes and the preferential infection of T<sub>EM</sub> in an experimental model of R5 HIV-1 infection. Our data suggest that HIV-1 infection in T<sub>EM</sub> can be an important step leading to CD4 $^{+}$  T lymphocyte decline. Our findings confirm the applicability of NOG-hCD34 mice as a useful model to study the dynamics of HIV-1 pathogenesis including CD4 $^{+}$  T lymphocytes depletion *in vivo*.

**3) Mechanism of Herpes Virus Neuropathogenesis: Y. ANDO, T. WATANABE, P. GEE and Y. KOYANAGI**

HSV-1 is a causative agent for fatal encephalitis in human. We generated a HSV-1 encephalitis-recovery model. When a GFP-expressing HSV-1 was inoculated into brain of infant rat, we found that some HSV-1-injected rats (27%; designated as severe) died within 48 hour after showing symptoms of quadriplegia or seizure or some injected rats (22%; designated as mild) died around 72 hour after showing weight loss or paresis. In the brain tissues, we found vast hemorrhagic necrotic damages and largely disseminated GFP<sup>+</sup> region. We detected many GFP<sup>+</sup> cells, which were confirmed as HSV-1<sup>+</sup> cells by staining with anti-HSV antibody along with extensive cell infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD68<sup>+</sup> macrophages, indicating massive dissemination of HSV-1 in brain. However, the other HSV-1-inoculated rats survived after showing the transient mild symptoms such as weight loss or paresis but not quadriplegia or seizure. In the brain tissue taken from recover-rats 36 hour after disappearing paralysis, we found focal neuronal tissue damages along with a small number of cell infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD68<sup>+</sup> macrophages in parenchyma and a fewer GFP<sup>+</sup> cells in the brain of the recover-rats compared with the number of GFP<sup>+</sup> cells in the brain of severe rats. These data indicated that limited but obvious HSV-1 infection occurred in brain of the recover-rats. To find novel host factors that function against HSV-1 infection in brain tissue, we used microarray analysis of messenger RNA comparing that of the recover-rat and the mock-infected brains. Some neuron-specific factors have been found.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME  
LABORATORY OF VIRAL PATHOGENESIS**

Izumi T , Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J and Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 9, 1, 2009.

Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology* 6, 53, 2009.

Shinoda Y, Hieda K, Koyanagi Y, Suzuki Y. Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes* 39, 165-175, 2009.

Yoshida T, Ebina H, Koyanagi. N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol* 53, 629-635, 2009.

Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y,

Ito M, Koyanagi Y. HIV-1 productive infection in CD4<sup>+</sup> effector memory T lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T lymphocyte depletion in humanized NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice. *Virology* 394, 64-72, 2009.

---

Kei Sato, Chuanyi Nie, Naoko Misawa, Yuetsu Tanaka, Mamoru Ito, and Yoshio Koyanagi. Characterization of HIV-1 pathogenesis and the infected cells in humanized mice, 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, D-179, Montreal, Canada, 2009 年 2 月 8-11 日

渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. Small GTPase Rac2 による HIV-1 増殖制御. 第 7 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2009 年 2 月 11-13 日

Yoshio Koyanagi, Mitochondria and membrane trafficking implication for HIV infection and pathogenesis, 4<sup>th</sup> GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM, Bochum, 2009 年 3 月 23-24 日

小柳義夫、佐藤佳、伊藤守. シンポジウム「ヒト血液幹細胞移植マウスのウイルス病原性解析への利用」第 56 回日本実験動物学会、大宮、2009 年 5 月 14-16 日

Kei Sato, Naoko Misawa, Chuanyi Nie, Rei Takahashi, Mamoru Ito, Kiyotaka Kuzushima, Kenzo Takada, and Yoshio Koyanagi. Epstein-Barr virus is productively replicated in humanized NOD/SCID/IL2g<sup>null</sup> mice simulating severe complications observed in patients with fatal EBV infection, 第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, P-017, 淡路島, 2009 年 9 月 8-11 日

Kei Sato, Seiji P Yamamoto, Naoko Misawa, and Yoshio Koyanagi. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species, 第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, P-018, 淡路島, 2009 年 9 月 8-11 日

Kei Sato. EBV lytically replicates and causes hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice, The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, P2-14, Kyoto, Japan, 2009 年 9 月 12-14 日

Yoshio Koyanagi, Virological and biochemical analysis of HIV-1 release inhibitor BST-2, The 10th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2009 年 9 月 28 - 29 日

Yoshio Koyanagi, Selective infection of CD4<sup>+</sup> effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice, The 10th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2009 年 9 月 28 - 29 日

Tadashi Watanabe, Youichi Suzuki, Masaaki Miyazawa, and Yoshio Koyanagi. Rho GTPase Rac2 modulates HIV-1 replication. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, 2009 年 9 月 28 - 29 日

小柳義夫、佐藤佳. HIV 感染におけるテトラスパニンの意義. 第 82 回日本生化学会大会, シンポジウム、神戸、2009 年 10 月 21 - 24 日



- 小柳 義夫、HIV-1 放出抑制分子 BST-2 の解明第 50 回日本熱帯医学会大会、シンポジウム、  
沖縄、2009 年 10 月 23-24 日
- 佐藤佳、三沢尚子、Chuanyi Nie、高橋玲、伊藤守、葛島清隆、高田賢藏、小柳義夫. 致死  
性 EBV 感染症モデルマウスの作製と病態解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、  
3WSA5、東京、2009 年 10 月 25-27 日
- 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一. レトロウイルスインテ  
グラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第 57 回日本ウイルス  
学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
- 小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、蝦名博貴、小柳義夫. Bst-2 と HIV-1 Vpu の相互  
作用メカニズムの解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25  
-27 日
- 渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. Rho GTPase family による HIV-1 複製抑制. 第  
57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
- 鈴木康嗣、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一. レトロウイルスゲノムの組み込み 機能を阻  
害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第 57 回ウイルス学 会学術集会、  
東京、2009 年 10 月 25-27 日
- 蝦名博貴、小柳義夫. DNA 損傷部位へのインテグラーゼ非依存レトロウイルス DNA の遺伝  
子組込み機構. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 25-27 日
- Koyanagi Y, HIV and EBV infection model using humanized, Workshop  
Taiwan-Japan“Host-Pathogen Interaction”, Kyoto, 2009 年 11 月 16 - 17 日
- 佐藤佳、山元誠司、三沢尚子、小柳義夫. 異種動物細胞株を用いたヒト BST-2/Tetherin の  
機能比較研究. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、062-335、名古屋、2009 年 11 月 26  
- 28 日
- 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森川裕子、小柳義夫、鈴木陽一、HIV-1 インテグラーゼ  
相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名  
古屋、2009 年 11 月 26 - 28 日
- Kei Sato, Naoko Misawa, Chuanyi Nie, Rei Takahashi, Mamoru Ito, Kiyotaka Kuzushima, Kenzo  
Takada, and Yoshio Koyanagi Epstein-Barr virus is productively replicated in humanized  
NOD/SCID/IL2g<sup>null</sup> mice simulating severe complications observed in patients with fatal  
EBV infection, 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 3-K-W63-7-0/P, 大阪, 2009 年  
12 月 2-4 日
- 小柳義夫、佐藤佳. テトラスパニンによるレトロウイルス感染制御. 第 32 回日本分子生物  
学会年会、シンポジウム、横浜、2009 年 12 月 9 - 12 日

**RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME  
LABORATORY OF VIRUS CONTROL**

- 1) Analyses of *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* gene in the pathogenesis of HTLV-1: Y. SATOU, P. MIYAZATO, K. TAKAI, T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, J. TANABE, K. SUGATA, N. TAGUCHI, A. NAKANISHI, G. MA, Y. MITOBE and M. MATSUOKA.**

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the first retrovirus that induces diseases in human. HTLV-1 causes a neoplastic disease, adult T-cell leukemia (ATL), and the inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis. HTLV-1 belongs to complex retrovirus, which encodes regulatory genes (*tax* and *rex*) and several accessory genes, such as *p30*, *p12*, *p13* and *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)*. Among them, *tax* is thought to play a central role in transformation of infected cells. However, since it is a major target of cytotoxic T-lymphocytes, its expression is often silenced in ATL cells to escape the host immune system. The *HBZ* gene, which is encoded by the minus strand of HTLV-1, contains a basic leucine zipper domain. Our previous studies showed that 3'LTR is intact and unmethylated in all ATL cells. From our studies, *HBZ* gene was transcribed in all of the ATL cell lines and primary ATL cells, while *tax* gene transcription was frequently silenced. In *HBZ*-transgenic mice, the number of CD4<sup>+</sup> T cells was increased, indicating that *HBZ* promotes proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo*. Dermatitis is frequently observed in *HBZ* transgenic mice, and in the skin, infiltration of CD4<sup>+</sup> T cells is also found. In addition, CD4<sup>+</sup> T cells infiltrate into alveolar septum. Such infiltration of CD4<sup>+</sup> T cells was reported in HTLV-1 carriers, indicating that the phenotype of *HBZ* transgenic mice is similar to that of HTLV-1 carriers. Interestingly, *HBZ* transgenic mice develop T-cell lymphoma more frequently than non-transgenic littermate after long latent periods. These findings suggest that *HBZ* has a crucial role for both leukemogenesis and HTLV-1-associated inflammatory diseases. Furthermore, we are now investigating cellular and molecular mechanism in the *HBZ*-induced pathogenesis.

- 2) Identification of cellular proteins interacting with *HBZ* and characterization of virological and pathological significance of the interaction: T. ZHAO, J. FAN, K. HAGIYA, G. MA, A. COUTTS, Y. SATOU and M. MATSUOKA.**

We are trying to identify cellular factors interacting with *HBZ* by using yeast two hybrid or functional analyses of various signaling pathways. In this study, we found that *HBZ* specifically suppressed NF- $\kappa$ B-driven transcription mediated by p65 and *tax* but not the alternative NF- $\kappa$ B signaling pathway. Using coimmunoprecipitation, we demonstrated the direct interaction between

HBZ and p65, and this physical association abrogated the DNA binding capacity of p65. In other aspect, HBZ induced p65 degradation through ubiquitination-dependent pathway. In addition, HBZ repressed transcription of selected classic NF- $\kappa$ B target genes. This study suggests that this selective binding to p65 modulates Tax mediated NF- $\kappa$ B activation.

**3) Characterization of the promoter regions for *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* gene: M. YOSHIDA, Y. SATOU and M. MATSUOKA.**

The *human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) basic leucine zipper factor (HBZ)* gene is encoded by the minus strand of HTLV-1 provirus, and transcribed from 3' long terminal repeat (LTR). However, the promoter region and its transcriptional regulation of *HBZ* gene remain unknown. We have characterized the promoters of the *HBZ* (*HBZ*) genes. The promoters of spliced (*sHBZ*) and unspliced *HBZ* (*usHBZ*) genes were TATA-less, which contained initiators and downstream promoter elements. We found that SP1 was a critical transcription factor for *sHBZ* gene expression. Chromatin immunoprecipitation assay demonstrated the binding of Sp1 to the promoter region of *sHBZ* gene. We compared the functions of two proteins derived from *sHBZ* and *usHBZ* gene, and found that *sHBZ* showed the stronger suppressive capability to Tax-mediated transcriptional activation through 5'LTR than *usHBZ*. Only the *sHBZ* gene had growth-promoting function for a T-cell line while *usHBZ* did not.

**4) The role of DNA double strand break repair enzymes in retroviral infection: Y. SAKURAI and M. MATSUOKA.**

Retrovirus synthesizes viral dsDNA by reverse transcription and integrates the DNA into the host genome by integration. DNA double strand break (DSB) repair enzymes are reported to be involved in these steps. However, the detailed mechanism is still unknown. We developed a new method for efficient cloning of retroviral integration sites, and analyzed the sequences surrounding HIV-1 integration sites in the mutant cells. In ATM-, Mre11-, NBS1- and Artemis-deficient cells, we identified two kinds of abnormal nucleotides between integrated viral DNA and the host genome: 1) GT dinucleotides, which should be removed by viral integrase during integration, and 2) inserted nucleotides of unknown origin. These results suggest that DSB repair enzymes regulate integration and protect the ends of viral DNA before integration. In Mre11-deficient cells, primer binding sites also remained, suggesting the involvement of Mre11 in reverse transcription. These abnormalities were also found in MLV integration sites. Moreover, the base preferences surrounding HIV integration sites were changed in ATM-deficient cells, suggesting that ATM is involved in HIV-1 integration site selection. These results indicated that DSB repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection.

**5) Resistant profiles of next-generation of HIV-1 fusion inhibitors: K. SHIMURA and M. MATSUOKA.**

Human immunodeficiency virus (HIV) gp41 plays a critical role in the initial event of the viral infection, fusion to target cells. C-terminal heptad repeat (C-HR) and N-terminal HR (N-HR) of gp41 form stable conformation during fusion, thus, HR derived peptides can suppress fusion between virus and target cell. Indeed, C-HR-derived peptide fusion inhibitor, enfuvirtide (T-20), has potent anti-HIV-1 activity, and has been used for the treatment of HIV-1 infection. However, as observed as other therapeutic drugs, T-20 resistant variants also emerged, hence it has hampered the efficient therapy. We have previously developed the electrostatically constrained peptide fusion inhibitors, SC34 and SC34EK, and reported that both have potent anti-HIV-1 activity against not only wild-type but also T-20 resistant variants. In this study, to understand the precise mode of action, we induced the resistant variants to SC34 and SC34EK *in vitro*. Various mutations were introduced in gp41-coding region, and further analysis revealed that accumulation of multiple mutations was necessary for sufficient resistance. These results demonstrate that electrostatically constrained peptide design is available to avoid the emergence of cross-resistance, and these inhibitors are promising as next-generation fusion inhibitors.

**6) Development of small inhibitors to HIV: K. SHIMUARA, T. NAITO, T. ISOBE and M. MATSUOKA.**

In general, from a standpoint of bioavailability and development of inhibitors, low molecular weight (LMW) compounds are favorable. We have screened numerous LMW compounds, which are obtained commercially or synthesized at Kyoto University for potent HIV activity. In 2009, we have continuously screened and then, we identified several LMW compounds that possess anti-HIV activity. These compounds showed anti-HIV activity with a concentration for 50% inhibition of less than 1  $\mu$ M. We will further develop to enhance the antiviral activity and reveal the mode of action.

**LIST OF PUBLICATIONS**

**RESEARCH CENTER FOR ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME  
LABORATORY OF VIRUS CONTROL**

Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kB. Blood 113: 2755-2764, 2009.

- Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- $\beta$  signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 284: 3334-3344, 2009.
- Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos SG, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *J Biol Chem* 53: 1013-1018, 2009.
- Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6:19, 2009.
- Ueno M, Kodama EN, Shimura K, Sakurai Y, Kajiwara K, Sakagami Y, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Synonymous mutations in stem-loop III of Rev responsive elements enhance HIV-1 replication impaired by primary mutations for resistance to enfuvirtide. *Antiviral Res* 82: 67-72, 2009.
- Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, Ito S, Kajiwara K, Izumi K, Sakagami Y, Oishi S, Ohkubo T, Kobayashi Y, Otaka A, Fujii N, Matsuoka M. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 891-899, 2009.
- Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S. Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res* 82: 115-121, 2009.
- Naito T, Izumi K, Kodama E, Sakagami Y, Kajiwara K, Nishikawa H, Watanabe K, Sarafianos SG, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced alpha-helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1013-1018, 2009.
- Oishi S, Ito S, Nishikawa H, Tanaka M, Ohno H, Otaka A, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Development of a novel fusion inhibitor against T-20-resistant HIV-1. *Adv Exp Med Biol* 611:389-91, 2009.
- Oishi S, Kamitani H, Koder Y, Watanabe K, Kobayashi K, Narumi T, Tomita K, Ohno H, Naito T, Kodama E, Matsuoka M, Fujii N. Peptide bond mimicry by (E)-alkene and (Z)-fluoroalkene peptide isosteres: synthesis and bioevaluation of alpha-helical anti-HIV peptide analogues. *Org Biomol Chem* 7: 2872-7, 2009.
- Oishi S, Koder Y, Nishikawa H, Kamitani H, Watabe T, Ohno H, Tochikura T, Shimane K, Kodama E, Matsuoka M, Mizukoshi F, Tsujimoto H, Fujii N. Design and synthesis of

membrane fusion inhibitors against the feline immunodeficiency virus. *Bioorg Med Chem* 17: 4916-4920, 2009.

Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Ohshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, Matsuoka M, Utsunomiya A, Yoshino T. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Am J Pathol.* 176:402-15, 2009.

Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J Mol Biol.* 392: 657-665, 2009.

Kajiwarra K, Watanabe K, Tokiwa R, Kurose T, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of a recombinant HIV-1 fusion inhibitor, SC35EK, with an N-terminal pyroglutamate capping group. *Bioorg Med Chem.* 17: 7964-7970, 2009.

Tanaka M, Kajiwarra K, Tokiwa R, Watanabe K, Ohno H, Tsutsumi H, Hata Y, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Oishi S, Fujii N. Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins. *Bioorg Med Chem.* 17: 7487-7492, 2009.

Michailidis E, Marchand B, Kodama EN, Singh K, Matsuoka M, Kirby KA, Ryan EM, Sawani AM, Nagy E, Ashida N, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation defective reverse transcriptase inhibitor. *J Biol Chem.* 2009.

Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T, Mesnard JM, Yasukawa M. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol.* 90:1806-1811, 2009.

Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos S. G, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors of HIV-1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* 284(8): 4914-4920, (2009).

松岡雅雄：ATL、HTLV-1 研究の軌跡と新たな潮流 分子細胞治療 8(6) 52-55, 2009.

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型とユビキチン化 生体の科学 60(6) 551-555, 2009.

---

Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology:HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4,2009.

Zhao T, Yasunaga J, Fuji M, Matuoka M, Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B. The 16<sup>th</sup> East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009.

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：第 49 回日本リンパ網内系学会総会、淡路、2009 年 7 月 9-11 日

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルスによる病原性発現機構：第 7 回 HAM 治療研究会、大阪、2009 年 7 月 31 日

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現機構：第 76 回発生工学・疾患モデル研究会例会、東京、2009 年 9 月 17 日

松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による発がん機構：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日

萩屋啓太、佐藤賢文、安永純一郎、松岡雅雄：ATF3 は HTLV-1 bZIP factor と相互作用し、ATL 細胞の増殖に寄与する：第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日

松岡雅雄：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：第 14 回遺伝子実験施設セミナー、熊本、2009 年 10 月 16 日

佐藤賢文、安永純一郎、吉田美香、宮里パオラ、趙鉄軍、高井健、清水桂、大島孝一、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23-25 日

櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：CD 4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- $\gamma$  産生を抑制し、*Listeria monocytogenes* 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、片桐晃子、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor トランスジェニックマウスにおける炎症性疾患の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：HIV 感染過程における DNA 修復酵素の役割：第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26 日-28 日

佐藤賢文、MIYAZATO Paola、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは Foxp3+制御性 T 細胞の機能及びホメオスタシスの異常を示し、慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月 2 日-4 日

## EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

### LABORATORY OF MOUSE MODEL

Our research objective is to understand the molecular mechanisms that control chromatin function and genome diversity & stability in mammals. To address this question, we are currently analyzing functional molecules which are expressed in the nucleus.

#### 1) **Role of G9a KMTase in embryo proper lineage on suppression of extraembryonic genes: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI**

Histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation is a repressive epigenetic mark for heterochromatin formation and transcriptional silencing. Genetic loss of a H3K9 lysine methyltransferase (KMTase), G9a leads drastic reduction of H3K9me2 and exhibits embryonic lethality at mid-gestation in mice, indicating that G9a and/or G9a-mediated H3K9 methylation is essential for mouse embryogenesis. However, how the loss of G9a affects mouse embryonic development is still unclear. Since G9a suppresses tissue specific genes in ES cells via H3K9 methylation, we hypothesize that G9a may control developmentally regulated genes in mouse embryogenesis. To gain insights into the transcriptional control of G9a *in vivo*, we isolated RNA from embryo proper and trophoblast cells of wild-type and *G9a* knockout (*G9a*-KO) litters. We then introduced them into microarray analysis to examine the differences of expression profiles between them. Subsequently, it was revealed that specific *Hox* family genes (reproductive homeobox: *Rhox*) were ectopically reactivated in *G9a*-KO construct. *Rhox* genes, which are localized on X-chromosome, are novel *Hox*-family genes characterized recently (*Cell*, 120 p369, 2005). It is shown that *Rhox* genes are expressed predominantly in reproductive tissues (testis and ovary) and placenta. *Rhox* genes display temporal and quantitative colinear pattern of expression, however, the molecular basis which contribute the establishment and maintenance of these unique expression remains to be solved. Interestingly, it was revealed that transcriptional suppression of some *Rhox* genes were achieved by DNA methylation. Furthermore, the DNA methylation-dependent silencing is occurred in a lineage-specific manner (specifically occurred in embryo proper-lineage) (*Genes Dev.*, 20, p3382, 2006). Regarding this notion, we speculate that both H3K9 methylation and DNA methylation machineries may cooperatively regulate colinear expression of *Rhox* genes. We are now going to set up chromatin immunoprecipitation analysis on *Rhox*-loci using embryo proper and trophoblasts of wild-type and *G9a*-KO mice.

#### 2) **Role of G9a HMTase for pre-implantation development in mice: M. TACHIBANA and Y. SHINKAI**



The oocyte serves the distinct purpose of transmitting the maternal genome and other maternal factors that are critical for post-ovulation events, such as zygotic gene activation (ZGA). In mice, ZGA dominantly occurs during the two-cell stage. We hypothesize that maternally inherited epigenetic factors such as histone modification enzymes may play an essential role on early embryogenesis. To investigate an effect of maternal deprivation of G9a, we crossed *G9a*-conditional KO mice and zona pellucida 3 (Zp3) –Cre transgenic line. The resulting Zp3-Cre, *G9a*F/F female mice were bred to wild-type males to test their fertility. In contrast to wild-type females that produced offspring following matings (~80%), Zp3-Cre, *G9a*F/F females displayed a reduced fertility (45%). In addition, the Zp3-Cre, *G9a*F/F females produced considerably small litters (2.2) compared to control females (7.1). To elucidate whether the ovulation is normal or not in Zp3-Cre, *G9a*F/F female, we accessed the numbers of oocytes from the superovulation experiment. Zp3-Cre, *G9a*F/F females could ovulate similar number of oocytes (~21) to those of control female (~20), indicating that maternal G9a is not necessary for this process. Then we fertilized maternally G9a-deprived oocytes with wild-type sperm and further cultured in vitro. After culturing for four-days, ~95% embryos derived from control oocytes reached blastocyst stage. In contrast, only 18% embryos could reach to this stage when they originated from maternally G9a-depleted oocytes. We concluded that maternal inheritance of G9a is necessary for normal embryonic development until implantation. One possible explanation for this phenotype is maternal G9a plays a crucial role on ZGA. To further elucidate the G9a-ZGA link, it will be important to verify the role of G9a-mediated H3K9 methylation and transcriptional suppression during early embryogenesis.

### **3) Expression of the mouse PR domain protein Prdm8 in the developing central nervous system: T. KOMAI and Y. SHINKAI**

The PR (*PRDI-BF1* and *RIZ* homology) domain family proteins were first noted to share the homology with the SET domain-containing histone lysine methyltransferases. Although only a few members of PR domain proteins were identified to possess histone methyltransferase activity, many of them are now well known to be key regulators for tissue development and/or cell differentiation.

We found that a member of PR domain proteins, Prdm8, is specifically expressed in the mouse brain. Immunohistochemical analysis of mouse embryos demonstrated that Prdm8 protein is expressed in particular types of neurons. In the retina, Prdm8 is specifically expressed in rod bipolar cells and a subpopulation of amacrine cells. In the developing spinal cord, Prdm8 expression is restricted to the ventral interneurons. In the brain, Prdm8 is mainly expressed in the layer 4 neurons of the neocortex. Since Prdm8 expression is tightly regulated in a spatio-temporal manner during neural development, we hypothesize that Prdm8 plays important roles in the process of neuronal

differentiation or maturation. We are now trying to examine the role(s) of Prdm8 in neuronal development by knocking out and knocking down Prdm8 in mice.

#### **4) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET: T. MATSUI and Y. SHINKAI**

Endogenous retroviruses (ERVs), retrovirus-like elements with long terminal repeats (LTRs), are widely dispersed in the euchromatic compartment in mammalian cells, comprising ~10% of the mouse genome. These parasitic elements are responsible for >10% of spontaneous mouse mutations. While DNA methylation plays an important role in proviral silencing in somatic and germ-lineage cells, an additional DNA methylation-independent pathway also functions in embryonal carcinoma and embryonic stem cells (ESCs) to inhibit transcription of the exogenous gammaretrovirus, murine leukemia virus (MLV). Intriguingly, a recent genome-wide study revealed that ERVs are also marked by histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) and H4K20me3 in ESCs but not in MEFs. However, the role these marks play in proviral silencing remains unexplored. Here, we show that the H3K9 methyltransferase ESET/Setdb1/KMT1E and the Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein 1 (KAP-1)/Trim28 are required for H3K9me3 and silencing of endogenous and introduced retroviruses specifically in ESCs. Furthermore, while ESET enzymatic activity is crucial for HP1 binding and efficient proviral silencing, the H4K20 methyltransferases Suv420h1/2 are dispensable for silencing. Strikingly, in DNA methyltransferase triple-knockout ESCs, ESET and KAP-1 binding and ESET-mediated H3K9me3 are maintained and ERVs are minimally derepressed. We propose that a DNA methylation-independent pathway involving KAP-1 and ESET/ESET-mediated H3K9me3 is required for proviral silencing during the period early in embryogenesis when DNA methylation is dynamically reprogrammed.

#### **LIST OF PUBLICATIONS**

#### **EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES**

#### **LABORATORY OF MOUSE MODEL**

- Balemans, M\*. Huibers, M. Eikelenboom, N. Kuipers, A. van Summeren, R. Pijpers, M. Tachibana, M. Shinkai, Y. van Bokhoven, H. and van der Zee, C.E.. Reduced exploration, increased anxiety, and altered social behavior: autistic-like features in *Ehmt1*<sup>+/-</sup> mice. Behavioral Brain Research, Nov 5. [Epub ahead of print]
- Inagaki, T<sup>#</sup>. Tachibana, M<sup>#</sup>. Magoori, K. Kudo, H. Tanaka, T. Okamura, M. Naito, M. Kodama, T. Shinkai, Y\*. and Sakai, Y\*. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase *JHDM2a* deficient mice. Genes to Cells, 2009, 14:991-1001.

- Komai T. Iwanari, H. Mochizuki, Y. Hamakubo, T. and Shinkai, Y\*. Expression of the mouse PR domain protein Prdm8 in the developing central nervous system. *Gene Expression Patterns*, 2009, 9:503-514.
- Link, P. Gangisetty, O. James, S. Woloszynska-Read, A. Tachibana, M. Shinkai, Y. Karpf, A\*. Distinct Roles for Histone Methyltransferases G9a and GLP in Cancer Germ-Line Antigen Gene Regulation in Human Cancer Cells and Murine Embryonic Stem Cells. *Molecular Cancer Research*. 2009, 7:851-862.
- Okamoto K. and Shinkai, Y\*. TRFH domain is critical for TRF1-mediated telomere stabilization. *Cell Structure and Function*, 2009, 34:71-76.
- Shirato, H. Ogawa, S. Nakajima, K. Inagawa, M. Kojima, M. Tachibana, M. Shinkai, Y. and Takeuchi, T\*. A Jumonji (Jarid2) protein complex represses cyclin D1 expression by methylation of histone H3-K9. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284:733-739.
- Wen, B. Wu, H. Shinkai, Y. Irizarry, R.A. and Feinberg, A.P\*. Large organized chromatin K9-modifications (LOCKS) distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 2009, 41:246-250.
- Yokochi T. Poduch K. Ryba T. Lu J. Hiratani T. Tachibana M. Shinkai Y. and Gilbert D.M\*. G9a selectively represses a class of late-replicating genes at the nuclear periphery. *PNAS*, 2009, 106:19363-19368.

眞貝洋一：「ヒストンメチル化と DNA メチル化制御系のクロストーク」最新医学・2009年・6月増刊号「幹細胞研究の最近の進歩」、最新医学社

- T. Matsui and Shinkai, Y.: ESET/SETDB1 localizes transcription start sites of mono-allelic expression genes. The 24<sup>th</sup> Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [II], June 23-26, 2009, Sapporo, Japan
- Tachibana, M. and Shinkai, Y.: Transcriptional and developmental regulation by G9a/GLP histone methyltransferase complex. The 24<sup>th</sup> Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [II], June 23-26, 2009, Sapporo, Japan
- Shinkai Y.: ESET/SETDB1 is essential for LTR-retroelement silencing in mouse embryonic stem cells. FASEB Summer Research Conferences, “Epigenetics, Chromatin & Transcription”. July 12-17, 2009, Snowmass Village, Colorado, USA
- Shinkai, Y.: Epigenetic Regulation of Gene Expression by Histone Methylation. Global COE Liaison Laboratory regular seminar, Kumamoto University December 2, 2009, Kumamoto, Japan
- 眞貝洋一：ヒストンリジンメチル化コードと生命機能制御、第56回日本実験動物学会総会シンポジウム、大宮、2009年5月14日

眞貝洋一：ヒストンメチル化と生命機能制御、国際医療センターセミナー、東京、2009年6月15日

眞貝洋一：エピジェネティクスと生命機能制御、第21回高遠・分子細胞生物学シンポジウム「組織器官形成とそのモデュレーション」、伊那、2009年8月27、28日

眞貝洋一：エピジェネティクスと生命機能制御、協和発酵キリン腎臓シンポジウム「エピジェネティクス研究から新たな創薬へ」東京、2009年10月10日

眞貝洋一：ヒストンリジンメチル化コードと生命機能制御、第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月21日

松井稔幸、眞貝洋一：ESET/SETDB1 は DNA メチル化非依存的にレトロエレメントを抑制する、第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月24日

松井稔幸、眞貝洋一：ヒストンメチル化酵素 ESET/SETDB1 による内在性レトロウイルス抑制機構、特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」第2回公開シンポジウム、品川、2009年11月25、26日

立花 誠、眞貝洋一：ヒストンのメチル化による胎盤系列特異的遺伝子の発現制御、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月

## EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES

### LABORATORY OF PRIMATE MODEL

It has been 26 years since human immunodeficiency virus (HIV-1), the causative agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) was first identified. Since then, our knowledge on HIV-1 and the pathophysiology of AIDS has grown enormously. Unfortunately, however, we have not yet developed an effective prophylactic measure or a thorough therapeutic intervention, and AIDS remains top priority among global public health agenda.

To develop effective preventive or therapeutic measures against AIDS, we need an experimental model system that recapitulates HIV-1 infection in humans. From the beginning of AIDS epidemic, HIV-1 has been known for its narrow host range. To overcome the narrow host range of HIV-1 and develop a dependable animal model for AIDS, our laboratory, first in the world, generated a chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV), that carries HIV-1 derived *tat*, *rev*, *vpu* and *env* genes in the backbone of simian immunodeficiency virus, a closely related simian virus to HIV-1. Since then, SHIV/macaque model has been further developed and there are currently several SHIV strains available in the field and some of them cause acute disease followed by AIDS-like clinical manifestations.

We have been pursuing the following subjects,

1. Development and improvement of SHIV/macaque models,
2. SHIV-induced pathogenesis,
3. Development of novel vaccines and evaluation using SHIV/macaque system,
4. Identification of virus reservoir in HIV-1 infected individuals under highly active anti-retroviral therapy (HAART) using SIV infected monkeys as a model.

In addition to the abovementioned projects, we have been making efforts to establish non-human primate disease model for flavivirus infection, especially, dengue hemorrhagic fever.

- 1) **High frequencies of resting CD4<sup>+</sup> T cells containing integrated viral DNA are found in rhesus macaques during acute lentivirus infections: Y. Nishimura, R. Sadjadpour, J. J. Mattapallil, T. Igarashi, W. Lee, A. Buckler-White, M. Roederer, T.W. Chun and M. A. Martin**

We and others have reported that the vast majority of virusproducing CD4<sup>+</sup> T cells during the acute infection of rhesus macaques with simian immunodeficiency virus (SIV) or CXCR4 (X4)-using simian/human immunodeficiency viruses (SHIVs) exhibited a nonactivated phenotype. These findings have been extended to show that resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes collected from SIV- or X4-SHIV-infected animals during the first 10 days of infection continue to release virus ex vivo. Furthermore, we observed high frequencies of integrated viral DNA (up to  $5.1 \times 10^4$  DNA copies per

$10^5$  cells) in circulating resting  $CD4^+$  T cells during the first 10 days of the infection. Integration of SIV DNA was detected only in memory  $CD4^+$  T cells and SHIVs preferentially integrated into resting naïve  $CD4^+$  T cells. Taken together, these results show that during the acute infection large numbers of resting  $CD4^+$  T cells carry integrated nonhuman primate lentiviral DNA and are the major source of progeny virions irrespective of coreceptor usage. Prompt and sustained interventions are therefore required to block the rapid systemic dissemination of virus and prevent an otherwise fatal clinical outcome.

**2) Initiation of antiretroviral therapy 48 hours after infection with simian immunodeficiency virus potently suppresses acute-phase viremia and blocks the massive loss of memory  $CD4^+$  T cells but fails to prevent disease: M. Kubo, Y. Nishimura, M. Shingai, W. Lee, J. Brechley, B. Lafont, A. Buckler-White, T. Igarashi and M.A. Martin,**

We investigated whether a 28-day course of potent antiretroviral therapy, initiated at a time point (48 h postinoculation) following simian immunodeficiency virus (SIV) inoculation when the acquisition of a viral infection was virtually assured, would sufficiently sensitize the immune system and result in controlled virus replication when treatment was stopped. The administration of tenofovir 48 h after SIV inoculation to six *Mamu-A\*01*-negative rhesus macaques did, in fact, potently suppress virus replication in all of the treated rhesus macaques, but plasma viral RNA rapidly became detectable in all six animals following its cessation. Unexpectedly, the viral set points in the treated monkeys became established at two distinct levels. Three controller macaques had chronic phase virus loads in the range of  $1 \times 10^3$  RNA copies/ml, whereas three noncontroller animals had set points of  $2 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  RNA copies/ml. All of the noncontroller monkeys died with symptoms of immunodeficiency by week 60 postinfection, whereas two of the three controller animals were alive at week 80. Interestingly, the three controller macaques each carried major histocompatibility complex class I alleles that previously were reported to confer protection against SIV, and two of these animals generated cytotoxic T-lymphocyte escape viral variants during the course of their infections.

**3) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy: T. Suzuki, N. Yamamoto, M. Nonaka, Y. Hashimoto, G. Matsuda, S. N. Takeshima, M. Matsuyama, T. Igarashi, T. Miura, R. Tanaka, S. Kato and Y. Aida**

The development of multidrug-resistant viruses compromises the efficacy of anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy and limits treatment options. Therefore, new targets that can

be used to develop novel antiviral agents need to be identified. One such target is the interaction between Vpr, one of the accessory gene products of HIV-1 and Importin  $\alpha$ , which is crucial, not only for the nuclear import of Vpr, but also for HIV-1 replication in macrophages. We have identified a potential parent compound, hematoxylin, which suppresses Vpr–Importin  $\alpha$  interaction, thereby inhibiting HIV-1 replication in a Vpr-dependent manner. Analysis by real-time PCR demonstrated that hematoxylin specifically inhibited nuclear import step of pre-integration complex. Thus, hematoxylin is a new anti-HIV-1 inhibitor that targets the nuclear import of HIV-1 via the Vpr–Importin  $\alpha$  interaction, suggesting that a specific inhibitor of the interaction between viral protein and the cellular factor may provide a new strategy for HIV-1 therapy.

**4) Immune impairment thresholds in HIV infection: S. Iwami, S. Nakaoka, Y. Takeuchi, Y. Miura and T. Miura**

Longitudinal studies of patients infected with HIV-1 reveal a long and variable length of asymptomatic phase between infection and development of AIDS. Some HIV infected patients are still asymptomatic after 15 or more years of infection but some patients develop AIDS within 2 years. The mechanistic basis of the disease progression has remained obscure but many researchers have been trying to explain it. For example, the possible importance of viral diversity for the disease progression and the development of AIDS has been very well worked out in the early-1990s, especially by some important works of Martin A. Nowak. These studies can give an elegant explanation for a variability of asymptomatic phase. Here, a simple mathematical model was used to propose a new explanation for a variable length of asymptomatic phase. The main idea is that the immune impairment rate increases over the HIV infection. Our model suggested the existence of so-called "Risky threshold" and "Immunodeficiency threshold" on the impairment rate. The former implies that immune system may collapse when the impairment rate of HIV exceeds the threshold value. The latter implies that immune system always collapses when the impairment rate exceeds the value. We found that the length of asymptomatic phase is determined stochastically between these threshold values depending on the virological and immunological states. Furthermore, we investigated a distribution of the length of asymptomatic phase and a survival rate of the immune responses in one HIV patient.

**5) Identification of functional domains in reovirus replication proteins  $\mu$ NS and  $\mu$ 2: T. Kobayashi, L. S. Ooms, J. D. Chappell and T. S. Dermody**

Mammalian reoviruses are nonenveloped particles containing a genome of 10 double-stranded RNA (dsRNA) gene segments. Reovirus replication occurs within viral inclusions, which are specialized nonmembranous cytoplasmic organelles formed by viral nonstructural and

structural proteins. Although these structures serve as sites for several major events in the reovirus life cycle, including dsRNA synthesis, gene segment assortment, and genome encapsidation, biochemical mechanisms of virion morphogenesis within inclusions have not been elucidated because much remains unknown about inclusion anatomy and functional organization. To better understand how inclusions support viral replication, we have used RNA interference (RNAi) and reverse genetics to define functional domains in two inclusion-associated proteins, muNS and mu2, which are interacting partners essential for inclusion development and viral replication. Removal of muNS N-terminal sequences required for association with mu2 or another muNS-binding protein, sigmaNS, prevented the capacity of muNS to support viral replication without affecting inclusion formation, indicating that muNS-mu2 and muNS-sigmaNS interactions are necessary for inclusion function but not establishment. In contrast, introduction of changes into the muNS C-terminal region, including sequences that form a putative oligomerization domain, precluded inclusion formation as well as viral replication. Mutational analysis of mu2 revealed a critical dependence of viral replication on an intact nucleotide/RNA triphosphatase domain and an N-terminal cluster of basic amino acid residues conforming to a nuclear localization motif. Another domain in mu2 governs the capacity of viral inclusions to affiliate with microtubules and thereby modulates inclusion morphology, either globular or filamentous. However, viral variants altered in inclusion morphology displayed equivalent replication efficiency. These studies reveal a modular functional organization of inclusion proteins muNS and mu2, define the importance of specific amino acid sequences and motifs in these proteins for viral replication, and demonstrate the utility of complementary RNAi-based and reverse genetic approaches for studies of reovirus replication proteins.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **EXPERIMENTAL RESEARCH CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES**

#### **LABORATORY OF PRIMATE MODEL**

- Nishimura, Y., Sadjadpour, R., Mattapallil, J.J., Igarashi, T., Lee, W., Buckler-White, A., Roederer, M., Chun, T.W., and Martin, M. A. (2009) High frequencies of resting CD4<sup>+</sup> T cells containing integrated viral DNA are found in rhesus macaques during acute lentivirus infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8015-8020.
- Kubo, M., Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W., Brenchley, J., Lafont, B., Buckler-White, A., Igarashi, T., and Martin, M.A. (2009) Initiation of antiretroviral therapy 48 hours after infection with simian immunodeficiency virus potently suppresses acute-phase viremia and blocks the massive loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells but fails to prevent disease. *J. Virol.*, 83: 7099-7108.



- Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S. N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T., Tanaka, R., Kato, S., and Aida, Y. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 838-843.
- Iwami, S., Nakaoka, S., Takeuchi, Y., Miura, Y., and Miura, T. (2009) Immune impairment thresholds in HIV infection. *Immunol. Lett.*, 123: 149-154.
- Iwami, S., Miura, T., Nakaoka, S., and Takeuchi, Y. (2009) Immune impairment in HIV infection: Existence of risky and immunodeficiency thresholds. *J. Theor. Biol.*, 260: 490-501.
- Kobayashi T., Ooms L. S., Chappell J D., and Dermody T. S. (2009) Identification of functional domains in reovirus replication proteins muNS and mu2. *J Virol.*, 83:2892-2906.
- Zurney J., Kobayashi T., Holm G. H., Dermody T. S., and Sherry B. (2009) The reovirus mu2 protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor-9. *J. Virol.*, 83:2178-2187.
- 

- 小林剛：分節 2 本鎖 RNA ウイルスにおける遺伝子操作系の確立、ウイルス学会湯河原キャンプ、2009 年 6 月 29-30 日、湯河原
- 三浦智行：霊長類エイズモデル研究の新展開、第 19 回日本数理生物学会年会、2009 年 9 月 9-11 日、東京
- 岩見真吾、三浦智行、竹内康博：AIDS ワクチン開発への理論的介入 -SHIV 感染実験と数理モデル-、第 19 回日本数理生物学会年会、2009 年 9 月 9-11 日、東京
- 岩見真吾、三浦智行、竹内康博：実験データによる SHIV 感染力推定理論の開発、第 19 回日本数理生物学会年会、2009 年 9 月 9-11 日、東京
- 松田健太、稲葉一寿、伊吹謙太郎、深澤嘉伯、松山めぐみ、斉藤尚紀、堀池麻里子、姫野愛、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：新規 CCR5 指向性 SHIV の作製とアカゲザルへの順化、第 148 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 25-27 日、鳥取
- 松田健太、稲葉一寿、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、松山めぐみ、堀池麻里子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：抗 HIV ワクチン評価に有用な R5 指向性 SHIV の作製、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
- 高原悠佑、武内寛明、石井洋、高橋尚史、三浦智行、五十嵐樹彦、俣野哲朗：ビルマ産アカゲザル SIV 感染により誘導される CTL エピトープの探索、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
- 間陽子、石井英樹、萩原恭二、鈴木辰徳、北原玄太、橋本祥江、野中瑞穂、松田剛、武田英里、薛光愛、山本典生、三浦智行、鈴木正昭：ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)Vpr の新規核移行機序を標的とする創薬開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
- 石井英樹、鈴木辰徳、松田剛、武田英里、三浦智行、間陽子、鈴木正昭：ヒト免疫不全に

ウイルス 1 型 (HIV-1) アクセサリータンパク質 Vpr 検出用試薬の開発、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京

岩見慎吾、佐々木顕、三浦智行：変異株の固定確立-確率過程によるモデリング-、第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26-28 日、名古屋

Iwami, S., Miura, T., Takeuchi, Y.: Experimental and theoretical perspective of SHIV pathogenesis. The Second International Conference on Infectious Disease Dynamics, Athens, Greece, Dec.2-4, 2009.

## **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH LABORATORY FOR VIRUS REPLICATION**

The following two projects are on-going in this laboratory: (I) Molecular epidemiology of HIV/SIV in central Africa; (II) Development of animal HAART model system for AIDS studies using novel HIV/SIV chimeric viruses (SHIVs) having part or full of the HIV-1-derived pol gene and macaque monkeys.

The research goal of the first project is to clarify the origin of AIDS virus and to predict its future by conducting the molecular phylogenetical analyses of HIV and its related primate lentiviruses collected by overseas expeditions, especially from central Africa where most divergent strains of HIV/SIV are circulating. The research goal of the second project is to establish the animal HAART model by use of newly constructed SHIVs that possess part or full of the pol gene of HIV-1. These novel SHIVs can potentially infect rhesus macaques. In addition, they are fairly sensitive to anti-HIV-1 drugs, suggesting that this novel system would be very useful to evaluate tested compounds at the in vivo level.

- 1) **Molecular epidemiology of HIV in Democratic Republic of Congo: E. Ido, S. Karhemere<sup>1</sup>, S. Ahuka<sup>1</sup>, M. Omokoko, M. Imani<sup>2</sup>, T. Tada, S. Iwamoto, A. Umehara, N. Dauly<sup>3</sup>, Z. Kashongwe<sup>2</sup> and J.J. Muyembe<sup>1</sup>** (<sup>1</sup>National Institute of Biomedical Research, DRC, <sup>2</sup>Bukavu General Hospital, DRC, <sup>3</sup>University of Kisangani, DRC)

Highly diversified HIV strains are said to be co-circulating in Central African countries. However, molecular epidemiological information about DRC is quite limited. In particular, little is known in the eastern part due to a long-term political instability since early 1990s. This is the very first report of the genotypic data of HIV in recent years from two major provincial cities, Bukavu in South Kivu Province and Kisangani in Oriental Province. Bloods were collected from a total of 180 AIDS-suspected patients who visited University Hospitals and nearby MSF clinics (Bukavu in 2007 and Kisangani in 2006 and 2008). The specimens were subjected to serological tests followed by a nested PCR in the pol genomic region (288 bp) and sequencing. Phylogenetic analyses revealed that the subtypic distributions obtained from two provinces were rather similar: the predominant subtype was A (55-60 %) followed by various other subtypes such as G, C, D, B, F, and H. It should be noted that considerable numbers of isolates (14-20 %) were grouped into U (unclassified) in both cities. The present distribution of HIV subtypes in eastern DRC can be partly explained by human migrations and events that occurred during the past decades. More importantly, it is still exhibiting the characteristic nature of a great genetic diversity, suggesting a hypothesis that the pandemic of HIV might have started somewhere in the Congo basin.

**2) Exposure to SIVmd-2 in southern Cameroon: public health implications: N. Ndembu<sup>1</sup>, L. Kaptue<sup>1</sup> and E. Ido (<sup>1</sup>Yaounde University Hospital, Cameroon)**

Compelling evidence appeared in 2002 of human exposure to a plethora of primate lentiviruses through hunting, handling of bushmeat and/or animals kept as pets in Cameroon. To determine SIV prevalence in pet animals, an analysis of 28 sera of nonhuman primates found no SIV infection in greater spot-nosed monkey (0/5) or chimpanzee (0/10), and a prevalence rate of 23.1% (3/13) in mandrills kept as household pets in southern Cameroon. Phylogenetical analysis based on pol-integrase region and mitochondrial cytochrome b gene showed that the newly found SIV from *Mandrillus sphinx* (SIVmndCM-202, SIVmndCM-211 and SIVmndCM-218) clustered significantly with SIVmnd-2. Questionnaire data were also collected to assess whether owners had experienced bites, scratches or exposure to blood and/or body fluid. Risk to human health from cross-species transmission of the newly identified SIVmnd-2 to infect humans remains unknown.

**3) Oral administration of a mixture of PR, RT and INT inhibitors to rhesus macaques that were persistently infected with SHIV-pr: E. Ido, M. Ishimatsu, T. Tada, S. Iwamoto and A. Umehara**

Although the current anti-retroviral therapy (ART) is truly effective to prolong the patient's life, the long-term uptake of drugs also appears to be raising issues such as troublesome side effects. Recently integrase (INT) inhibitors have been added in a list of the medicines in addition to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) inhibitors. Emergence of multi-drug-resistant virus will be soon a serious concern. We should present recommendations of the regime(s) including INT inhibitors as early as possible ideally by pre-clinical experiments. However, no good animal model to test efficacies of anti-HIV-1 drugs especially by oral administration is available so far. Thus we attempted to establish a new animal ART model in which a combination of three groups of drugs can be tested using monkeys. Two rhesus macaques infected with SHIV-pr that possesses the PR gene of HIV-1 were used in this study. When the monkeys were persistently infected, a mixture of three drugs (nelfinavir, didanosine, and raltegravir) contained in a solid diet was orally administered to them twice a day for 4 weeks. Doses were determined by body weight according to those for human use. Plasma viral loads and CD4 cells were monitored during the whole period of ART. Drug concentrations of raltegravir in plasma were also measured by LC-MS. Plasma viral loads of two monkeys reached to  $10^5$ - $10^6$  copies/ml before medication. The viral load of one monkey was suppressed below the detection limit by the 4th week of ART, but quickly rebounded to the initial level after the cease of medication. The trough of raltegravir was sufficiently beyond the effective value. The load of another monkey decreased one order of magnitude by the 2nd week of ART, but this animal gradually lost appetite during ART and died of pneumonia thereafter. The fact that one

monkey died showing AIDS-like symptoms indicates that our SHIV-pr was not only replication-competent but potentially pathogenic in monkeys. Overall, the present data suggest that this new animal ART model was fairly good to evaluate efficacies of various combinations of anti-HIV-1 drugs in vivo.

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH**

#### **LABORATORY FOR VIRAL REPLICATION**

- Ndembi, N., Kaptue, L., Ido, E.: Exposure to SIVmd-2 in Southern Cameroon: Public Health Implications, *AIDS Rev.*, 11(3):135-9, 2009.
- Ido, E., Ishimatsu, M., Tada, E., Iwamoto, S., Umehara, A.: Oral administration of a mixture of PR, RT and INT inhibitors to rhesus macaques that were persistently infected with SHIV-pr, *Retrovirology*, 6 (Suppl 2):P42, 2009.
- Ido, E., Ishimatsu, M., Tada, T., Ibuki, K.: Novel SHIVs that possess HIV-1-derived pol genes can infect rhesus macaques, *J. Med. Primatol.*, 38 (Suppl. 1): 74-75, 2009.

- 
- Ido, E., Ishimatsu, M., Tada, E., Iwamoto, S., Umehara, A.: Oral administration of a mixture of PR, RT and INT inhibitors to rhesus macaques that were persistently infected with SHIV-pr. *Frontiers of Retrovirology, Complex Retroviruses, Retroelements and Their Hosts*, Montpellier, France, Sep 21-23, 2009.
- Ido, E., Omokoko, M., Karhemere, S., Ahuka, S., Tada, T., Iwamoto, S., Daully, N., Kashongwe, Z., Ikuta, K., Muyembe, J.J.: The most recent molecular epidemiological data of HIV in Democratic Republic of Congo. 50th Annual Meeting of Japanese Society of Tropical Medicine, Okinawa, Japan, Oct 22-23, 2009.
- Ido, E., Ishimatsu, M., Tada, T., Iwamoto, S., Umehara, A.: Establishment of an animal HAART model: Oral administration of PR, RT and INT inhibitors to macaque monkeys persistently infected with SHIV-pr that possesses the HIV-1-derived protease gene. 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Model for AIDS, Boston, USA, Oct 28-31, 2009.
- Ido, E., Karhemere, S., Ahuka, S., Omokoko, M., Imani, M., Tada, T., Iwamoto, S., Umehara, A., Daully, N., Kashongwe, Z., Muyembe, J.J.: Molecular epidemiology of HIV in eastern Democratic Republic of Congo. 5th International Congress on Infectious and Parasitic Diseases, Kinshasa, Democratic Republic of Congo, Nov 4-6, 2009.
- 井戸栄治、Jean-Raoul Choclat、Fabien Niama、Jean-Vivien Mombouli、多田哲子、梅原 綾、岩元静香、Henri-Joseph Parra : コンゴ共和国辺境地域における HIV の血清学的調査、

第 27 回日本国際保健医療学会西日本地方会、大阪、2009 年 2 月 28 日

井戸栄治、多田哲子、Stormy Karhemere、Masimango Imani、岩元静香、梅原 綾、Magot Omokoko、Zaccharie Kashongwe、Jean-Jacques Muyembe：コンゴ民主共和国南キヴ州に流行する HIV の遺伝子解析、第 24 回日本国際保健医療学会学術大会、仙台、2009 年 8 月 5-6 日

井戸栄治、Jean-Raoul Chocolat、Fabien Niama、Jean-Vivien Mombouli、多田哲子、梅原 綾、岩元静香、Henri-Joseph Parra：コンゴ共和国の辺境地域ウェスト・キュヴェット州における HIV の分子疫学調査、第 24 回日本国際保健医療学会学術大会、仙台、2009 年 8 月 5-6 日

井戸栄治、多田哲子、岩元静香、石松美沙、梅原 綾、高橋昌明、金田次弘：SHIV-pr が持続感染したアカゲザルに PR、RT、および INT に対する各阻害剤を混合して経口投与した効果について、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

井戸栄治、Jean-Raoul Chocolat、Fabien Niama、Jean-Vivien Mombouli、多田哲子、梅原 綾、岩元静香、Henri-Joseph Parra：コンゴ共和国の最奥地ウェスト・キュヴェット州における HIV の分子疫学調査、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

井戸栄治、多田哲子、Stormy Karhemere、Masimango Imani、岩元静香、梅原 綾、Zaccharie Kashongwe、Jean-Jacques Muyembe：コンゴ民主共和国東部に位置する南キヴ州における HIV の分子疫学、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

井戸栄治、多田哲子、岩元静香、石松美沙、梅原 綾、高橋昌明、金田次弘：HIV-1 由来のプロテアーゼ遺伝子を持つ SHIV-pr が持続感染したアカゲザルに対する Raltegravir を含む経口投与による HAART の効果、第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

## **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH**

### **LABORATORY FOR HOST FACTORS**

Our laboratory studies the interactions between viruses and host factors using retroviruses including human immunodeficiency virus (HIV) and murine leukemia virus (MLV) as model systems. Retrovirus synthesizes a DNA copy of its genome after entry into the host cell. The newly synthesized viral DNA is then integrated into chromosomal DNA. Although a key enzyme for the DNA insertion reaction is a viral protein termed integrase (IN), variety of cellular factors have been put forward as important regulator of the integration step in infected cells. Our current research especially focuses on the cellular proteins that impact on retroviral integration.

#### **1) Dysfunction of retroviral integration complex by cellular kinases: Y. SUZUKI, Y. SHINODA and Y. SUZUKI**

Retroviral integration is executed by a high-order nucleoprotein complex called the preintegration complex (PIC) that contains viral DNA and IN together with viral and cellular proteins. Barrier-to-autointegration factor (BAF), a non-specific DNA binding protein, is one of the cellular components of MLV and HIV-1 PICs. It has been demonstrated that BAF protects viral DNA from autointegration and enhances intermolecular integration activity of the PIC *in vitro* by its DNA-binding property. BAF is also regulated for cell cycle progression and phosphorylated via a family of cellular serine/threonine kinases called vaccinia-related kinase (VRK), which causes the loss of the DNA-binding activity of BAF. A recent study with poxvirus has shown that BAF can bind vaccinia viral DNA in the cytoplasm and inhibit viral DNA replication *in vivo*. However, vaccinia virus counteracts this inhibition by expression of B1 kinase, a viral homologue of VRK that reduces DNA-binding activity of BAF by the phosphorylation. These evidences raise the possibility that VRK-mediated phosphorylation of BAF may influence intermolecular integration activity of the PIC through alternation of DNA-binding activity of BAF. In this study, we obtained evidence that murine VRK family proteins (VRK1 and VRK2) are capable of disrupting the intermolecular integration activities of MLV PICs, which was accompanied by removal of BAF from viral DNA within the PICs. In addition, phosphorylated form of BAF failed to stimulate integration activity of PICs. Furthermore, treatment of HIV-1 PICs with human VRK1 resulted in abolition of integration activity of the PICs *in vitro* as well. Our finding suggests the presence of intrinsic inhibitory mechanism for the retroviral integration, which is executed by cellular kinases such as VRKs.

#### **2) Role of a HECT-domain E3 ubiquitin ligase, Huwe1 in HIV-1 infection: S. YAMAMOTO and Y. SUZUKI**

Integration is an indispensable step for retrovirus replication, which is catalyzed by IN.

We have recently identified Huwe1 as a cellular interactor for MLV and HIV-1 IN. Huwe1 is a HECT-domain containing E3 ubiquitin ligase that has been reported to mediate the ubiquitination of Mcl-1 and p53, and induce consequent degradation of these proteins. Although Huwe1 was likely to be incorporated into the retroviral PIC shortly after entry of virus, the susceptibilities of target cells to single-round MLV and HIV-1 vectors were not affected when endogenous Huwe1 was depleted from the target cells by siRNA knockdown technique. This indicated that Huwe1 is an inert adaptor protein at the early phase of the retroviral infection. However, knockdown of Huwe1 in a human T cell line (MT-4 cells) increased the infectivity of HIV-1 from virus-infected cells. In addition, we found that Huwe1 interacted with HIV-1 Gag-Pol precursor protein through an IN region. Huwe1 therefore appears to modulate the production of infectious virion via functional association with Gag-Pol precursor at the late phase of virus infection.

### **3) Inhibitory effect of Rho GTPase Rac2 on HIV-1 replication\*: T. WATANABE and Y. SUZUKI**

Rho GTPase family proteins including Rho, Rac, and Cdc42 act as intracellular switches to regulate membrane trafficking, actin rearrangement, and effective signal transduction as well as T cell development. However, Role of the Rho GTPase family proteins in HIV-1 infection remains unclear. In this study, we focused on one of the Rho GTPases, Rac2, which is reported to be expressed only in hematopoietic cell lineages. To elucidate function of Rac2 in HIV-1 replication, we established T cell lines in which FLAG-tag-fused Rac2 was over-expressed and analyzed the susceptibility to HIV-1. We found that Rac2 expression rendered T cell lines more resistant to cytopathic effect caused by HIV-1 infection, and virus replications in the Rac2 expressing cells were significantly inhibited. Co-transfection experiments of HIV-1 producing plasmid together with Rac2 expression plasmid showed that Rac2 appeared to suppress gene expression of HIV-1 proviral DNA, thereby decreased the level of virus production. Furthermore, constitutive active (GTP binding) form of Rac2 enhanced the inhibitory effect. Our results suggest that Rac2 is a novel suppressive factor for HIV-1 infection.

*\* This project is conducted in collaboration with Laboratory of Viral Pathogenesis/Institute for Virus Research (Professor Yoshio Koyanagi)*

## **LIST OF PUBLICATIONS**

### **CENTER FOR EMERGING VIRUS RESEARCH**

### **LABORATORY FOR HOST FACTORS**

Shinoda, Y., K. Hieda, Y. Koyanagi, and Y. Suzuki. Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes* 39, 165-175, 2009.



---

Suzuki, Y. Disruption of retroviral integration complex by a cellular kinase: The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, September 13-14, 2009

鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、小柳義夫：レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. Rho GTPase family による HIV-1 複製抑制：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

鈴木康嗣、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一：レトロウイルスゲノムの組み込み機能を阻害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

鈴木陽一：細胞性因子によるレトロウイルスのゲノム組み込み機構の制御 - エイズウイルスの制圧に向けて-. 中高温微生物センター開所記念シンポジウム、山口、2009 年 11 月 19 日

鈴木陽一：インテグレーションの分子メカニズムと細胞性因子 - 新しい阻害剤の開発に向けて. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、小柳義夫、鈴木陽一：HIV-1 インテグレース相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26-28 日

## REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse (Tg) and knockout mouse (KO) under the animal committee of our institute. We also perform cryopreservation of mouse fertilized eggs. Current staffs are Kitano and Miyachi. Results of last three years are as follows.

### 1) Freezing embryos

2007	74 strains	22,069 embryos
2008	62 strains	20,525 embryos
2009	75 strains	20,337 embryos

### 2) Introduction of mouse strains from outside

	Frozen embryos	Live mice
2007	3 strains	4 strains
2008	4 strains	2 strains
2009	7 strains	2 strains

### 3) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2007	11	2,937	32 (1.1%)
2008	52	20,379	125 (0.6%)
2009	94	33,821	190 (0.6%)

### 4) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2007	37	5,237	367 (7.0%)
2008	49	7,252	357 (4.9%)
2009	52	4,587	242 (5.3%)

## LIST OF PUBLICATIONS

### REPRODUCTIVE ENGINEERING TEAM

Takeo, T., Kaneko, T., Haruguchi, Y., Fukumoto, K., Machida, H., Koga, M., Nakagawa, Y., Takeshita, Y., Matsuguma, T., Tsuchiyama, S., Shimizu, N., Hasegawa, T., Goto, M., Miyachi, H., Anzai, M., Nakatsukasa, E., Nomaru, K. and Nakagata, N. Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at cold temperature. Cryobiology. 58, 196-202, 2009.

---

宮地 均、田中 彰人、小中 さつき、眞貝 洋一：BALB/cを用いたTgマウスの作製.  
第43回日本実験動物技術者協会総会、新潟、2009年10月9日・10日

宮地 均：DAP213を用いたマウス胚の凍結保存. 第23回動物生殖工学会、  
東京、2009年12月5日

## **Computer Network of Institute for Virus Research**

Institute for Virus Research LAN system (IVR-LAN) has administrated by the network committee consisted of five staffs (Prof. Yodoi, Prof. Akiyama, Prof. Toyoshima, Assistant Prof. Takemoto and Technical specialist Sagara). IVR-LAN service has covered for researchers in some medical departments as well as IVR and the primary purpose of IVR-LAN is to offer accessibility to the Internet in support of their studies.

IVR-LAN has provided a variety of network services, including E-Mail, WEB-mail, WWW, File-sharing, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. Main services are working on Sun Sparc platform with Solaris 8 and 10, DELL with Linux. This year we have replaced the mail server which had been running Sendmail with new one running Postfix. It is known that Postfix is designed as a secure MTA.

We have to move servers to a neighboring building on May 2010 since the project starts to make our building earthquake-resistant. The IVR-LAN committee has discussed the project schedule with KUINS (Kyoto University Integrated information Network System) how to maintain our services including the exclusive services such as a licence management, and tried to prepare the future construction of network carefully.

The number of infected mails is approximately thirty thousand a week and it represents 4 % of the incoming mails to IVR. However IVR-LAN has adequately equipped, we must have a responsibility for sending/getting data. A few accidents have occurred in this year. Many people just don't pay any attention to security before it might violate the safety. IVR-LAN users need to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto university.

## **STAFF CHANGES OF THE INSTITUTE**

### **Appointments**

During the period of January to December 2009, the following new staffs were appointed; Dr. Yousuke Takahama as a Visiting Professor of Bioresponse Regulation Laboratory, Dr. Isamu Matsunaga as an Associate Professor of Department of Viral Oncology, Dr. Takayuki Miyazawa as an Associate Professor of Department of Cell Biology, Dr. Shinobu Chiba as an Assistant Professor of Department of Viral Oncology, Dr. Kiyohiro Takahashi as an Assistant Professor of Department of Genetics and Molecular Biology, Dr. Hirotaka Ebina as an Assistant Professor of Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome, Dr. Toshiaki Tsubota as an Assistant Professor of Experimental Research Center for Infectious Diseases, Dr. Hideyuki Tanabe as a Visiting Associate Professor of Bioresponse Regulation Laboratory, Drs. Hironori Niki, Hideki Nishitoh and Tetsuro Matano as a Lecturer (part time) of Department of Viral Oncology, Dr. Jyun Nishihira as a Lecturer (part time) of Department of Biological Responses, Drs. Masaaki Miyazawa, Hiroyuki Mano and Takeshi Imamura as a Lecturer (part time) of Research Center for Acquired Immunodeficiency Syndrome, Dr. Tomohiko Takasaki as a Lecturer (part time) of Experimental Research Center for Infectious Diseases.

### **Departure**

Dr. Yota Murakami moved to Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Dr. Keiji Okamoto moved to The Scripps Research Institute, U.S.A., Dr. Eiichi Kodama Moved to Tohoku University Hospital, Drs. Hajime Nakamura, Yoko Hirabayashi, Reiko Hirai, Motoyuki Tanaka, Toshifumu Inada, Osamu Takeuchi, Hideyuki Tanabe, Koya Ariyoshi, Shinya Suzu, Takaji Wakita, Hideyuki Saya and Tetsuya Taga left the Institute.

## **THE SCIENTIFIC LECTURES OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH**

The annual scientific lecture of this Institute was held on July 10, 2009 at the Kyoto University Hall.

### **Program**

Opening Remarks: Ryoichiro Kageyama

1. Biology of Retroviruses: Light and Shadow, Takayuki Miyazawa , this Institute
2. Evolution of Mammalian Placentation by Retrotransposon-derived genes. Fumitoshi Ishino, Tokyo Medical and Dental University
3. Redox Regulation of Stress Signals; Cohabitation, Environment and Inflammation, Junji Yodoi, this Institute
4. Regulation of stress responses by the ASK family kinases, Hidenori Ichijo, The University of Tokyo

## SEMINARS OF THE INSTITUTE FOR VIRUS RESEARCH

Thirty-three seminars were held at the Institute for Virus Research under the auspices of the Institute in 2009. Twenty lecture were from abroad and Thirteen others were from Japan.

- |             |                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| January 6   | Dr. Mohamed Nejmeddine, Wright-Fleming Institute, Imperial college London, U K. “Ultrastructure of HTLV-1 virological synapse and function of tax protein”.                                                                           |
| January 13  | Dr. Jun Takehisa, University of Alabama at Birmingham, U.S.A. “Origin and biology of siv in wild-living gorillas”.                                                                                                                    |
| January 22  | Dr. Keizo Nagasaki, National Research Institute of Fisheries and Environment of Island Sea (FEIS), Japan. “Virus in water --from phenomenology and mechanism to applied science--”.                                                   |
| February 24 | Dr. Katsuji Sugie, Research Scientist, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, Japan. “CD4 cell-secreted, posttranslationally modified cytokine GIF suppresses Th2 responses by inhibiting the initiation of IL-4 production”. |
| March 5     | Dr. Massimo Palmarini, University of Glasgow Veterinary, U K. “Endogenous retroviruses, evolution and modern civilization”.                                                                                                           |
| March 16    | Dr. Yoko Hirabayashi, National Institute of Health Sciences, Japan. “Biology of Aryl hydrocarbon receptor”.                                                                                                                           |
| March 19    | Dr. So Nakagawa, Ntional Institute of Genetics, Japan. “Evolutional analysis of the translation initiation mechanism”.                                                                                                                |
| April 17    | Dr. Neil Segil, University of Southern California, U.S.A. “Development and regeneration of the inner ear: coordinating cell cycle and differentiation – constraining notch signaling.”                                                |
| April 20    | Dr. Berta Alsina, Universitat Pompeu Fabra, Spain. “Establishment and development of the neurogenic domain in the inner ear”.                                                                                                         |

- May 21 Dr. Yohei Hizukuri, Nagoya University, Japan. “Bacterial nano-machine motor: An approach to rotary mechanism of the bacterial flagellar motor in *Escherichia coli*”.
- June 4 Dr. Amelia J. Eisch, Department of Psychiatry, UT Southwestern Medical Center, U.S.A. “Cell intrinsic regulation of adult hippocampal neurogenesis by Cdk5 and Notch1”.
- June 30 Dr. Naoshi Dohmae, RIKEN, Japan. “Proteomics techniques for post translational modification”.
- July 1 Dr. Masaru Ishii, Osaka University, Japan. “Chemokine-mediated migration control of osteoclast precursors visualized by in vivo bone imaging: A novel point of regulation for 'osteimmunology'”.
- July 9 Dr. Dong Sung An, Department of Medicine, UCLA, U.S.A. “RNA interference induces CCR5 down-regulation in systemic lymphoid organs including in the gut of the NOD/SCID-h BLT mouse model”
- July 31 Dr. Jun Nishihira, Hokkaido Information University, Japan. “Structure and function of macrophage migration inhibitory factor (MIF)”
- August 21 Dr. Hiroshi Tsuda, Baylor College of Medicine, Department of Molecular and Human Genetics, U.S.A. “Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, a fly view”.
- August 31 Dr. Yoshiaki Nishimura, Laboratory of Molecular Microbiology, NIAID, NIH, U.S.A. “Primate lentivirus infection of resting CD4<sup>+</sup> T cells in vivo as macaque models for acute HIV-1 infection”.
- September 3 Dr. Sadayuki Okura, U K. Division of Virology, MRC National Institute for Medical Research, U K. “Recognition of murine leukaemia virus capsid by TRIM5 $\alpha$ ”.
- September 11 Dr. Jochen Zimmer, Harvard Medical School, U.S.A. “Structural basis for SecA mediated protein translocation”.



- September 18 Dr. Hironori Niki, Ntional Institute of Genetics, Japan. "A gene network of morphogenesis in the rod shaped bacterium ".
- September 24 Dr. Takeshi Imamura, Institute for Genome Research, The University of Tokushima, Japan. "In vivo light imaging develops revolutionary cancer research ".
- October 6 Dr. Kazuhiro Yagita, Osaka University, Japan. "Development of mammalian circadian clock: differentiation of ES cells and generation of oscillators".
- October13 Dr. Hitoshi Sakano, The University of Tokyo, Japan. "Axon wiring and neural map formation in the mouse olfactory system".
- October13 Dr. Michael Gale Jr, School of Medicine University of Washington, U.S.A. "Regulation of innate antiviral defenses by the flaviviridae".
- October 30 Dr. Yosuke Takahama, The University of Tokushima, Japan. "T-cell repertoire formation in multiple thymus microenvironments".
- November 16 Dr. Takaharu Okada, RIKEN RESEARCH, Japan. "Trafficking and interaction of B and T cells in antibody responses" .
- November 17 Dr. Hideharu Hashimoto, Wayne Rollins Research Center Emory University, U.S.A. "Interaction between SRA domain of UHRF1 and TTRF domain of Dnmt1 is important to target Dnmt1 to hemi-methylated CpG site".
- November 19 Dr. Edward L. Murphy, Jr., University of California, U.S A. "Update from the HTLV outcomes study (host): mortality, neurologic disease and immunology among "healthy" HTLV-I and -II carriers".
- November 25 Dr. Robert F. Hevner, Seattle Children's Research Institute, U.S.A. "Brain abnormalities in a patient with monosomy 1p36: possible relation to multiple Hes gene loss".
- November 25 Dr. Branden R. Nelson, Seattle Children's Research Institute, U.S.A. "Long-range,contact-dependent Delta-Notch signaling during mammalian corticogenesis".

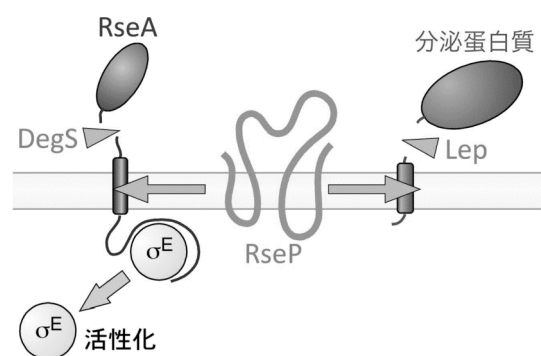
- December 1 Dr. Setsuko Sahara, Molecular Neurobiology Laboratory The Salk Institute for Biological, U.S.A. “Controls of the frontal cortical size and the neuronal number during development”.
- December 8 Dr. David M. Gilbert, Florida State University, U.S.A. “Replication timing as an epigenetic fingerprint of stem cell identity ”.
- December 14 Dr. Kit Pogliano, University of California, San Diego, U.S.A. “Investigating membrane and protein dynamics during bacillus subtilis cell division ”.

## I. First Group (秋山・森・千葉)

昨年ポスドクとして当グループに加入した千葉志信博士が4月より助教に就任し、9月には檜作洋平博士がポスドクとして新たに参加しました。

### 膜内切断プロテアーゼ RseP の膜タンパク質品質管理における新たな役割

分泌タンパク質は、N 末端にシグナルペプチド (SP) を持つ前駆体として合成され、膜透過に伴って SP 部分が切り離されます。真核生物では、この切断により生じた SP は膜内切断プロテアーゼの一種である Signal Peptide Peptidase (SPP)により切断され、膜から除去されると考えられています。一方、原核生物では SPP のホモログが存在せず、SP がどのような運命をたどるのかは分かっていません。これまでに私達は、大腸菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP が、膜タンパク質 RseA の膜貫通配列 (TM)を切断する事により、表層ストレス応答に関わる転写因子 $\sigma^E$ の活性化に必須の役割を果たしている事を示してきました。RseA 以外の RseP の生理的基質は分かっていませんでしたが、RseP が予想外に広い基質特異性を持ち、RseA とは配列上相同性のない他の膜タンパク質の TM を切断し得る事や、 $\beta$ -lactamase (Bla)の SP 由来の配列を含むモデルタンパク質が RseP 依存的に切断される事などを見出したことから、RseP が SP の分解に関わる可能性について検討しました。その結果、RseP が、*in vivo*、*in vitro*において Bla SP 内部の疎水性領域を切断すること、様々な分泌タンパク質の SP が *in vivo* で RseP 依存的に切断を受ける事などが明らかになりました。これらの事は、大腸菌においては RseP が一般に SP の切断に関わっている事を強く示唆しています。さらに、RseP の機能欠損を、膜タンパク質品質管理に重要な膜プロテアーゼ FtsH の欠損と組み合わせると、合成致死となる事を見出しました。RseP は、 $\sigma^E$ 表層ストレス応答の制御に加え、SP を含む膜タンパク質の分解による品質管理に関わる可能性が考えられます。(斎藤、秋山)



### 部位特異的 *in vivo* 光架橋実験法による SecG 近接因子 YfgM の同定

バクテリアのタンパク質膜透過は、モータ ATPase SecA とトランスロコン SecYEG が中心的な役割を果たします。SecG は、2 個の膜貫通領域(TM)を持ち、SecA の構造変化に呼応して自身の膜内の配向を反転させ、SecA による膜透過駆動を促進すると考えられています。その分子メカニズムは不明なままです。私たちは、近年 Schultz らが開発した部位特異的 *in vivo* 光架橋実験法というユニークな実験手法を用いることにより、SecG が、SecA あるいは他の細胞因子とどのように相互作用しているのかの解明を目指しました。その結果、SecA の反応サイクルに連動して、SecG の細

胞質ループが SecA 近接型、SecY 近接型の 2 つの状態をとる可能性を示唆するデータが得られました。また、SecG は、TM2 近傍の細胞質ループ領域で未知の因子と近接していることが明らかになりました。そこで、MS 解析によりこの未知因子の同定を試み、機能未知タンパク質 YfgM を見出しました。yfgM 欠失株を用いた *in vivo* 光架橋実験で架橋産物が検出されなかったことも、この結果を支持しています。現在のところ、SecG と YfgM が近接していることの生理的意義は明らかではありませんが、興味深いことに、yfgM 遺伝子と同じオペロンの直下には、外膜タンパク質のバイオジェネシスに関わる YfgL (BamB) がコードされています。YfgM が C 末端の大きな領域をペリプラズム側に向けていることを示唆するデータが得られていることや、yfgM 欠失株では有意な表層ストレス応答が観察されたことなどから、外膜タンパク質が膜透過されてから外膜に組み込まれるまでの過程の、まだあまり解明されていない局面で、YfgM が働いている可能性を今後検討していきたいと考えています。(田中、森)

#### 翻訳途上鎖による自身の翻訳伸長反応の停止と、それを介した蛋白質局在化装置の活性モニターの分子機構

私たちはこれまで、従来機能を持たないと見なされてきた翻訳途上鎖が、「活性センサー」や「遺伝子発現スイッチ」として働くことで細胞機能を制御しうることを報告してきました。例えば、SecM は大腸菌において蛋白質膜透過活性をモニターし、その活性が低下した時に、蛋白質分泌モーターである SecA ATPase の合成を誘導します。MifM は枯草菌において蛋白質の膜への組み込み活性をモニターし、その活性低下を感知すると、蛋白質膜組込チャネルのひとつである YidC2 の合成を誘導します。これらの因子は、カルボキシ末端付近に自身の翻訳を一時停止（アレスト）させる特殊なアミノ酸配列を持ち、そのアレストモチーフがリボソームのトンネルと相互作用することで翻訳アレストを起します。一方、これらの因子は、アミノ末端に分泌シグナル（SecM）や膜組込シグナル（MifM）を持つことで、膜透過や膜組込の基質として振る舞います。SecM や MifM が正しく局在化される過程と共役して翻訳アレストは解除されますが、局在化の過程に異常が生じると、翻訳停止が継続し、mRNA 上に停止したリボソームによる mRNA の二次構造破壊を介して、オペロン下流に存在する *secA* や *yidC2* の翻訳を促進します。翻訳途上鎖とリボソームのどのような相互作用が翻訳アレストを引き起こすのかという点を理解するために、これまでも SecM や MifM の遺伝学的解析がなされてきました。今年度は、MifM の翻訳停止部位の解析から、MifM が複数の翻訳アレスト産物を生じることを見いだしました。SecM や他の機能的翻訳アレスト因子はいずれも単一のアレスト産物を生じると考えられているため、翻訳停止位置の曖昧さは MifM に特徴的であるといえます。また、この結果は、翻訳途上鎖による翻訳アレスト機構の多様性を理解する手がかりになるのではないかと考えています。(千葉、秋山)

また、peptidyl-tRNA 加水分解の前後を組み合わせた二次元電気泳動法を利用して、翻訳途上鎖と翻訳完了蛋白質とを分離して可視化することに成功しました。この実験系を用いることで、細胞内に於ける翻訳途上鎖の全体像や個々の途上鎖の挙動を追跡できるものと期待しています。(伊藤、秋山)

## II. Second Group (酒井・柳川)

### 新規 LRP6 結合蛋白 Krtap13 による Wnt シグナル伝達経路活性化の分子機構の解析

柳川は、Wnt の Co-receptor である一回膜貫通型蛋白 LRP6 の細胞質ドメインに結合する新規蛋白として、Keratin associated protein 13 (Krtap13)を、見いだした。

驚いた事に、Wnt 非存在下、Krtap13 を強制発現させるだけで、Wnt 経路の著しい活性化が生じる事が、ヒト 293T 細胞を用いたレポーターアッセイにより明らかになった。Krtap13 は、ヒトでは 174 アミノ酸からなり、Cys-Gln に富む 10 アミノ酸からなる反復構造を持ち、毛包、汗腺、などでの発現が知られているが、Krtap13 の機能また Wnt 経路との関係は不明である。Krtap13 の作用点は Axin を含むその上流であり、Krtap13 の発現は、 $\beta$ -catenin 蛋白質の蓄積を誘導した。また、Krtap13 は、Dvl とともに結合する事から、LRP6 と Dvl は Krtap13 を介して ternary complex を形成する事が判明した。さらに Krtap13 による Wnt 活性化には、LRP6 と Dvl の両者が必須であった。蛍光免疫二重染色を行うと、Krtap13 発現細胞に於いては、Krtap13 と Dvl は細胞膜上で共局在し、Dot 状に染色された。つまり、Krtap13 は、LRP6 と Dvl の両者と結合する事により、Wnt 刺激の場合と同様の、LRP6-Dvl 凝集体を形成させる事によって、Wnt 経路を活性化しているとのモデルが、考えられた。

現在、種々の組織で Krtap13 を高発現する Transgenic mouse (Tg) を作成し、そこでの腫瘍の発生の有無や、器官形成への影響を判定するプロジェクトを進めている。Krtap13 の cDNA の上流に lox-polyA-lox 配列を挿入した Trans gene を持つ Tg マウスと組織特異的に Cre を発現する Tg マウスを交配し、組織特異的に Krtap13 を高発現させる。また一方、Krtap13 が新たな癌遺伝子として働く事を想定し、Krtap13a の著しい高発現、あるいは異所が、Wnt 経路を活性化し、癌を誘導している可能性を検討している。ヒト、マウスの各種腫瘍から樹立された培養細胞、さらにはヒトの各種腫瘍検体において、Krtap13 の著しい高発現が観察されるものがあるかを検索している。(柳川)

### ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染による悪性腫瘍形成機構の解明

HPV 感染症は代表的な STD (Sexually Transmitted Disease : 性感染症) であり、広く蔓延していることが知られています。また近年ではその感染が若年層に広がっていることが問題となっています。HPV 感染は発がんに関連することが知られていて、特に子宮頸癌では、ほとんどの発症例で HPV の感染が確認されており、HPV 感染が子宮頸癌発症の主要なリスクファクターであると考えられています。HPV 感染によるがん化を防ぐためには、HPV の感染・複製を抑制することが効果的であると考えられます。しかし HPV の複製・遺伝子発現の制御は、上皮細胞の分化に強く依存していて、通常の組織培養では HPV の生活環を再現できないので、これまでその制御機構はほとんど分かっていませんでした。私たちは既に皮膚モデル培養系を用いて、HPV の複製を組織培養下で再現しています。この系をさらに発展させるべく、独自の HPV レプリコンを構築し、効率よく HPV の複製・遺伝子発現機構を解析する手法を検討しています。また一方で、機能のよく分かっていないウイルス制御遺伝子、特に E4 と E5 に注目し、それらの生物活性の同定を行っています。これらの遺伝子機能から、ウイルス複製の調節機構を探り、抗ウイルス剤開発の標的を見出したいと考えています。(梶谷、佐塚、酒井)

### HIV-1 の病原性発現機構の解析

私たちの研究室では HIV の制御遺伝子の生物活性に興味を持ち研究を行っているが、現在は HIV-1 による細胞死誘導機構の解明も進めている。特に、感染細胞周辺の CD4 陽性細胞が apoptosis 誘導によって細胞死する“bystander cell death”と呼ばれる細胞障害機構に関して、そのウイルス側の要因を明らかにすると同時に、そこに関与する宿主側因子の同定を目指した研究を行っている。また、HIV-1 のアクセサリ遺伝子である Vpu と Nef に関して、その新規生物機能の検索もすすめている。(中村、酒井)

脂質生物学と免疫学の有機的連携をもとに、「脂質免疫」という新しい生体応答システムの全容解明とそれを基盤にした新しいワクチンパラダイムの確立を目指した研究を展開している。結核を中心とした抗酸菌感染症研究は、菌と宿主の co-evolution の視点から研究を深め、新たな遅延型アレルギー応答の実証やこれまで知られていない脂質機能分子の発見へと結実した。また、脂質免疫はウイルス感染症においても重要な役割を果たしているとの考えから、当研究所霊長類モデル研究領域の五十嵐教授、三浦准教授との共同研究を進め、SIV 感染サルにおける脂質免疫標的分子を同定した。脂質免疫という切り口から結核やエイズの制御を目指す研究室の活動は、来年度以降大きく展開するものと期待している。

教室の学生は、小森崇矢君 (D3)、森田大輔君 (D2) がそれぞれの研究を順調に発展させるとともに、後輩の指導にも大きく貢献した。加藤久美子さん、時岡温子さん、中尾瞳さんは、修士論文を完成し巣立っていった。本研究室での経験をもとに、今後社会人としての活躍を期待したい。そして生命科学研究科修士学生として、新たに浦川哲生君、小林千沙さんが加わった。二人とも精力的に研究を進めており、頼もしく感じている。

#### 生体内環境に適応した抗酸菌糖脂質代謝と免疫認識

結核菌細胞壁表層を構築する糖脂質群は宿主環境との接点に存在することから、宿主との相互作用の結果としてダイナミックに変容し、感染病態の形成に深く関わりと考えられる。細胞内寄生細菌として年余にわたり宿主環境に暴露されるがゆえに、人工培地で培養した結核菌では解明し得ない糖脂質代謝とそれに対する宿主応答の存在が想定される。主要な細胞壁糖脂質と考えられていたトレハロースジミコール酸 (TDM) は強力な自然免疫刺激活性を持つことが知られていたが、宿主感染に伴い宿主由来のグルコースを基質として利用したミコール酸転移反応により、グルコースモノミコール酸 (GMM) に置換されることが明らかとなった。GMM は TDM に比して自然免疫刺激活性が微弱なことから、この宿主基質を利用した糖脂質置換反応は、病原菌の宿主自然免疫系からのエスケープ機構と位置づけられる。これに対して、宿主は新たに生成された GMM を標的とした CD1 依存性免疫応答を惹起する。実際、BCG 感染モルモットを用いた研究から、GMM を標的とした遅延型アレルギー応答の存在が明らかとなった。この応答の主体はインターフェロンガンマを産生する CD8 陽性キラーT 細胞であり、防御免疫に貢献することが想定される。これらの観察は、宿主免疫系と結核菌が、相互のインターアクションを通して互いを磨いてきたことを示唆している。

#### エイズ防御における脂質免疫の実態解明

従来、ウイルスは固有の脂質を有しないことから、脂質免疫の標的とはならないと考えられてきた。しかしながら、エイズウイルスなどの病原性ウイルスは、MHC 分子を介したタンパク質抗原特異的免疫応答を阻害あるいは回避する戦略を進化の過程で獲得しており、宿主防御の成立にはこれに代わる獲得免疫機構の存在が想定される。私たちは、霊長類モデル研究領域・五十嵐教

授の研究室との共同研究を通して、SIV 感染サル免疫応答を詳細に解析し、獲得免疫の標的となる lipidic なウイルス分子の同定に成功した。この分子の免疫認識機構の解明は、新しい chemical class のエイズワクチン開発にもつながることが期待され、精力的に研究を展開している。



今年は、生命科学研究科の修士一回生として高市剛と濱内珠美の二名が入学し、染田真孝、福岡あゆみの二名は修士課程を修了して博士後期課程に進学し、佐藤宏昌は修士課程終了後、(財)日本食品分析センターに就職した。生命科学研究科博士後期課程の単位を取得した高園園は引き続き当研究室で研究を続け、中津海洋一は九州大学の研究員として新たな研究を開始した。また、理学博士の学位を9年前に取得しUSAに留学していた風間啓敬が、生命科学研究科の独立のポストである助教(特任)として赴任し、当研究室で研究を開始した。研究費の経理を初めとする研究室の秘書業務は中橋直子が執り行い、研究室の円滑な運営が可能となっている。また、高村綾子は国際学生セミナーの実施や研究科長業務のサポートを行っている。米原は2009年4月から生命科学研究科の研究科長となり多忙を極めることになっているが、研究室の研究は今後も新たに発展していくことが期待される。

本研究分野では、米原らが見いだしたアポトーシス誘導レセプター分子 Fas の研究を出発点とし、アポトーシスやそれ以外の新しい細胞死に関する研究、細胞死関連分子の多様な生物活性に関する研究を行っている。各個人の研究内容について簡単に紹介する。

当研究室で博士の学位を取得した博士研究員の小林洋平は「染色体凝縮不全→二核細胞の出現→細胞増殖の進行(染色体の不安定化を伴い、がん化の原因となる)→EF-1 $\alpha$  (eEF1A1)の発現低下→caspaseに依存しない新しい細胞死の誘導」という自らが新しく見いだした経路の分子機構と生理機能をさらに解析し、通常の培養細胞株ではこのような現象が常に引き起こされており、以上な二核細胞は除去されていることを示唆するデータを取得している。高市剛はこの新規細胞死の生体内での機能を明らかにすべく、eEF1A1を高発現するトランスジェニックマウスの作製を試みている。伊藤亮は、p53が機能しない細胞(多くのがん化しつつある細胞の状態)では、染色体に傷害を受けた後に細胞が増殖を続けると、caspaseに依存しない新規の細胞死が誘導されるという現象を見だし、解析を行っている。これらの細胞死の透過型電子顕微鏡観察によって、これらの細胞死は従来知られている細胞死(アポトーシス、ネクローシス、オートファジー細胞死等)とは全く異なっていることが明らかとなっている。

桐山真利亜は、我々がFasシグナルとの関連で見いだした巨大分子FLASHについて、FLASHが付着がん細胞株の細胞周期S期の進行に必要不可欠であることを示し、FLASHに会合するARS2という興味深い分子を同定し、ARS2とFLASHの会合がS期進行に必要であることを、この会合にはFLASHの中央領域に存在する13アミノ酸残基からなるFARB sequenceと命名した配列が必要不可欠であることを明らかにした。濱内珠美は、FARB sequenceの中のどのアミノ酸残基がARX2との会合に重要かを解析している。南田佳孝は、FLASH遺伝子の変異マウスやKO誘導可能なES細胞株の作製や解析を実行し、FLASHの発現抑制マウスは胎生3.5日で消滅するにもかかわらず、ES細胞やES細胞から分化した様々な体細胞はFLASHが発現していなくても生存するという興味

深い結果を取得し、解析を進めている。そして、中西育久は、FLASH の細胞増殖に関わる活性に対する感受性を決定する細胞内因子を探索するための解析を開始し、非感受性を誘導する因子の存在を示唆する結果を得ており、この因子を解明を目的に解析を行っている。また、への FLASH の役割、FLASH の個体レベルと発生初期段階での生理機能を明らかにしている。また、Kuang Wan-Fen は FASH に会合することが判明した転写制御分子複合体と FLASH の結合様式やその結合の意義について解析を進めている。

一方、アポトーシスに必要不可欠の caspase に関する研究も行っている。菊池弥奈は、マウス T 細胞株の増殖と生存維持に caspase-8 前駆体のプロテアーゼ活性が必要である現象の分子機構を明らかにすべく研究を行っている。黒木は caspase-8 が血球系細胞の分化と増殖にどのように関わるかについて、胎児肝細胞を用いた骨髓キメラマウスを作製して解析している。これらの研究から caspase-8 の新たな機能が分子レベルで解明されることが期待される。一方、caspase-8 の活性化に関わるアダプター分子 FADD と会合する新規分子を高田顕徳が同定に成功しているので、FADD-caspase-8 の機能等について、新たな研究が展開されることが期待される。

また、ES 細胞を用いた遺伝子の発現誘導系や発現抑制系を染田真孝と福岡あゆみが作製しており、染田は Fas や FADD のドミナントネガティブフォームが神経細胞分化に及ぼす影響を検出し解析を進めている。

異なったアポトーシス誘導機構に関わる Fas と Bim は免疫系で重要な機能を有している。Fas に関しては、高橋涼香が遺伝的背景を変化させた Fas KO マウスでアレルギーの発症等の全く新しい表現型を見いだしており、今後の発展が強く期待される。また、抗体産生細胞へと向かう B 細胞の後期分化段階における Bim の新しい機能を高園園が見いだしており、新しい知見を証明するための解析を行っている。

助教の李慶權は、アポトーシスと細胞増殖の調節機能の相関関係を、新たな観点から分子レベルで解析している。

准教授の酒巻和弘は、様々なモデル生物を用いた caspase の機能解析、数理モデルを組み込んだ caspase の活性化と生理機能の関連解析を行い、新たに同定している caspase-8 特異的な基質タンパク質の機能解析も行っている。

助教の村上昭は、マウスの胚発生初期に、内・中・外胚葉が誘導される機構を、胚性幹細胞(ES 細胞)の分化を誘導する系を用いて解析している。幾つかのシグナル伝達系の関与が知られているが、Wnt シグナルが果たす役割を明らかにすることを試みている。特に、Wnt3 と Wnt8a が関与する機構に焦点を絞って解析している。

本年度は、生命科学研究科の清木麻季子（M1）が新たに加わりました。6月には、特別研究員のフセイン・ハッサン・アリが退職し、北海道大学医学研究科の特任助教となりました。研究に参加しているのは、准教授の土方誠、秘書の松田裕子、他の大学院生では、生命科学研究科の久島透嘉（D2）、Qi Yue（D2）、阿部雄一（M2）、筒井智恵子（M2）の4名が在籍しています。

#### 不死化肝細胞の立体培養系の確立とこれを用いた患者血液由来C型肝炎ウイルス(HCV)の生活環の解析

我々は独自に樹立した不死化肝細胞を中空糸による立体培養系を用いて培養することで患者血液由来の HCV の生活環のすべてを再現することに成功した。この培養系では異なる患者由来の種々の HCV が多様な増殖パターンや粒子産生パターンを示し、この細胞から感染性のウイルス粒子が培地中に産生されることを見いだした。電子顕微鏡によってこのウイルス粒子が約 34 nm の中心顆粒の周囲に約 7nm のスパイク様構造を有することが観察された。この培養系では一ヶ月間にわたる長期感染増殖も観察されるが HCV の中には感染後急速に遺伝子複製が行われ、自然免疫系を誘導し、インターフェロンを産生することによって、その増殖が抑制されるものもあった。しかしながらそのような状況下でもさらに増殖してくる HCV も存在した。それぞれの遺伝子の部分配列の解析から、前者と後者の HCV 株はそれぞれ最初に用いた患者血清には存在するが全く異なる HCV 株であり、後者は前者の増殖によるインターフェロン誘導の後に増殖してくることがわかった。以上のようにこの培養系は患者血液由来の HCV と細胞の相互作用の研究に利用することが可能であると考えられた。

#### 患者血液由来C型肝炎ウイルス HCV の感染増殖に機能する細胞内シグナル系の解析

我々は不死化肝細胞を立体培養することで患者血液由来の HCV の生活環のすべてを再現することに成功した。この細胞は通常の平面培養では効率の高い感染増殖や感染性粒子産生が観察されなかったため、立体培養によって細胞にこれら HCV の生活環を支持するための何らかの変化が生じた可能性が考えられた。そこでマイクロアレイ法を用いてこの2つの異なる培養法で培養した不死化肝細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、HCV の生活環に関連する細胞側因子の同定を試みた。その結果、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)- $\alpha$ の標的遺伝子群が立体培養によって誘導されていることを見出した。そこで PPAR- $\alpha$ のアゴニストを含む培地で平面培養した不死化細胞を培養すると HCV の感染増殖は亢進された。また、アンタゴニストを用いることで平面培養した場合も立体培養した場合も HCV の感染増殖が抑制された。このことから PPAR- $\alpha$ のシグナル系が HCV の感染増殖に重要な役割をもつことが明らかとなった。

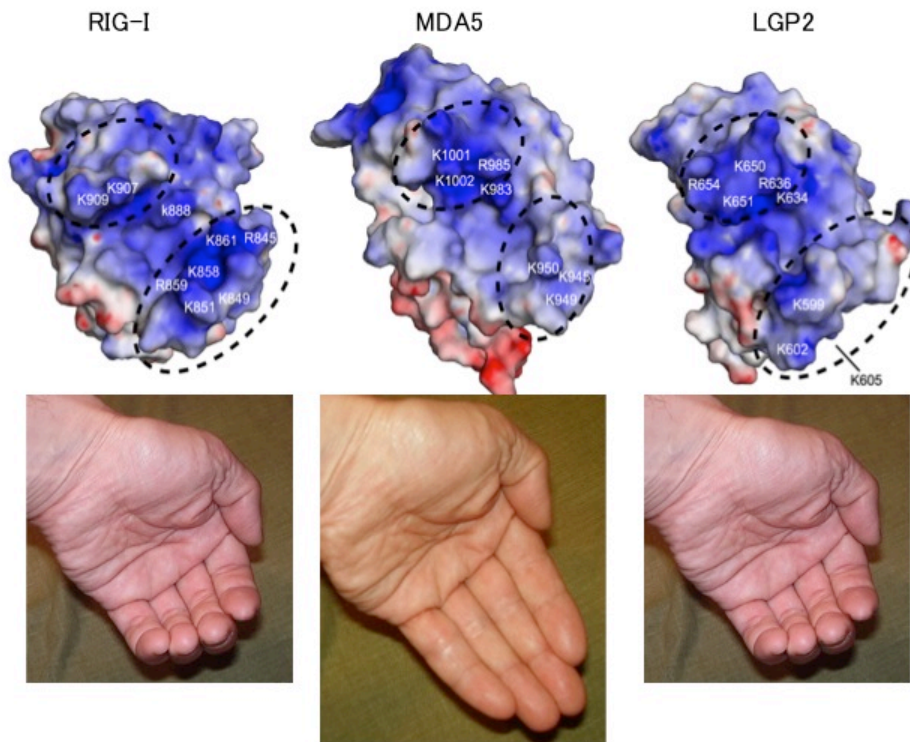
2009年度のメンバーは、藤田尚志（教授）、米山光俊（準教授）、高橋清大（助教）、尾野本浩司（非常勤職員）、小野口和英（早稲田大学大学院生命理工研究科博士後期課程5年、生命科学研究科交流学生）、Anna Wrabel（生命科学研究科博士課程3年）、成田亮、呉成旭（生命科学研究科博士課程2年）、影山麻衣子、劉知昇（Yoo Ji-Seung）（生命科学研究科博士課程1年）、船曳正英（医学研究科博士課程1年）、應田涼太、佐藤圭、常喜儒彦、高松詩穂理、西川千紘（生命科学研究科修士課程2年）、高橋あゆみ、呉展昇（Ng Chen-Seng）（生命科学研究科修士課程1年）、竹村明澄、森本志保（技術職員）、森田裕弥（秘書）の21名であった。

当研究分野ではウイルス感染に応答して引き起こされるI型インターフェロンの発現誘導などの、自然免疫反応のメカニズムを研究している。この一連の反応は細胞がウイルスの感染を感知することから開始される。この反応をつかさどるセンサー分子が retinoic acid-inducible gene-I, (RIG-I)であることを発見した。RIG-Iに類似したMDA5、LGP2という分子も存在しており、これらを総称してRIG-I like receptor (RLR)と呼ぶ。本年度の研究成果によって得られたRLRによる二重鎖RNAの認識のモデルを図に示す。

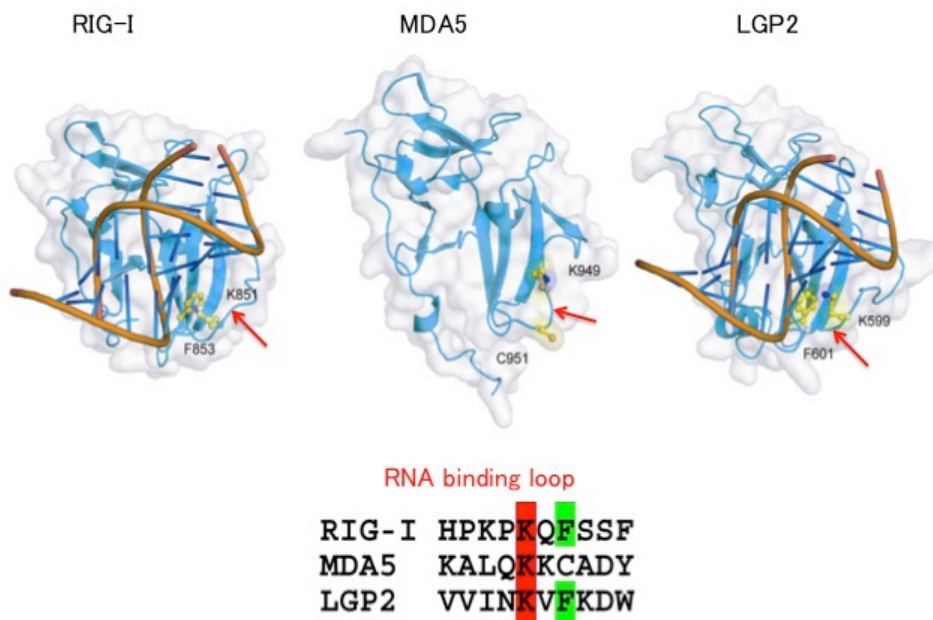
#### 図 ウイルス RNA センサーの立体構造

- 1 NMR法によって決定したRLRのカルボキシル末端側のRNA結合ドメイン（CTD）の構造を示す。蛋白質の表面の構造モデル。いずれのCTDにもくぼみ状の構造がある。RIG-IとLGP2ではそのくぼみが深く、MDA5では広がった浅いくぼみになっている。下：手によるくぼみのモデル。
- 2 RLRのリボンモデル。RNA結合ループを矢印で示す。RNA結合ループには保存されたリジン残基（K）とRIG-IとLGP2に保存されたフェニルアラニン残基（F）が存在する。RIG-IとLGP2の立体構造に二重鎖RNAの構造を重ね合わせるとぴったりはまり込み、フェニルアラニンがRNAと相互作用する可能性が示唆されている。実際の二重鎖RNAとの結合はRIG-IとLGP2が高く、MDA5とのアフィニティは有意に低い。異なるウイルスに対して特定のRLRが使われることを反映していると考えられる

## ウイルスRNAセンサーの立体構造-1



## ウイルスRNAセンサーの立体構造-2





## 研究プロジェクト

- 1) RIG-I の立体構造と活性化機構の解析 (高橋清、影山)
- 2) RIG-I の細胞内局在と活性化の解析 (尾野本、常喜、竹村、米山)
- 3) マウス個体での RLR の機能の解析 (船曳、尾野本、森本、米山)
- 4) RLR と自己免疫疾患の解析 (高橋あ、尾野本、米山)
- 5) 各種細胞における抗ウイルス応答の網羅的解析 (呉、尾野本、Wrabel)
- 6) 抗ウイルス自然免疫反応とマイクロ RNA (應田、米山)
- 7) マクロファージにおける抗ウイルス応答の解析 (西川、尾野本、佐藤)
- 8) 抗ウイルス応答におけるミトコンドリアの機能 (小野口、高松、Ng)
- 9) 抗ウイルス応答における新規ヘリカーゼの関与に就いて (Yoo、尾野本)

## ニュース、報道

(独) 科学技術振興機構 JST のサイエンスニュースネットワークに当研究室の研究内容等が紹介されました。

・2010 年 1 月 13 日 昌子の部屋：第 8 回 藤田尚志先生 (京都大学ウイルス研究所教授) 前編「インフルエンザと獲得免疫・自然免疫」<http://sciencenews.jp/index29.html>

・2010 年 1 月 15 日 昌子の部屋：第 8 回 藤田尚志先生 (京都大学ウイルス研究所教授) 後編「自然免疫の未来」<http://sciencenews.jp/index30.html>

2009 年 6 月 9 日読売新聞科学欄に当研究分野の「細胞内センサー」の研究内容が紹介されました。



# 日本の底力

## 新型インフルの新薬も期待

DNA が自然免疫を活性化することを知った徳永・福岡女学院看護大学長

「再発見」  
審良さんの発見より10年以上早く、DNA が自然免疫の鍵を握っていることに気づいた人がいる。元国立感染症研究所長の徳永徹・福岡女学院看護大学長だ。

徳永さんは1970年「結核ワクチンのBCGを注射するとモルモットのがんが治った」という米国の研究成果に驚き、BCGの成分と作用を詳細に分析。84年、抗がん作用を示す成分

「細胞内センサー」  
TLRがある場所は細胞膜などの表面だけでなく、細胞の中に入り込んで増殖を始めたウイルスを探知するには別のセンサーが必要だ。京都大ウイルス研究所の藤田尚志教授らは2004年、細胞質中を漂いながらインフルエンザやC型肝炎などのウイルスに反応する「リグアン・レセプター(RLR)」という新しいセンサーを発見した。

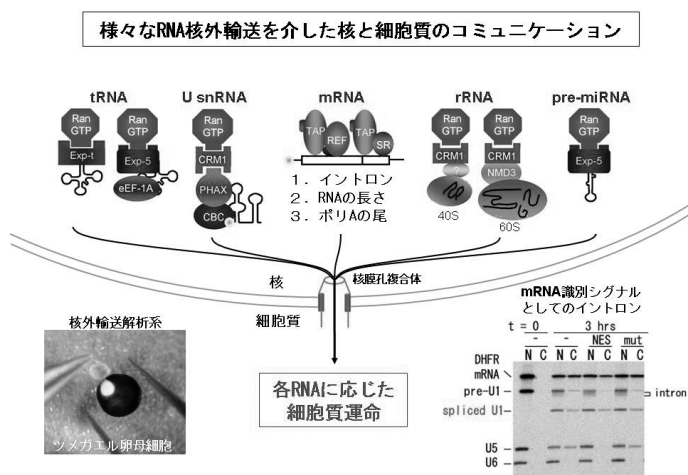
インフルエンザウイルスなどの遺伝子はRNAで、増殖時にはDNAより太い二重らせん構造を作る。RLRはこの構造を見つけると、細胞に抗ウイルス作用のあるインターフェロンを作らせる信号を出す。

一方、ウイルス側もRLRのセンサーを切ってしまうNSという遺伝子を持っており、この遺伝子の働きが感染力や症状の強さと関係しているらしい。藤田教授は「NSを抑えるような新薬を開発し、タミフルなどと併用すれば、新型インフルエンザなどの治療に役立つだろう」と話す。

DNAを遺伝子に持つウイルスを探知する細胞内センサーは見つかっておらず、世界中で研究が進んでいる。

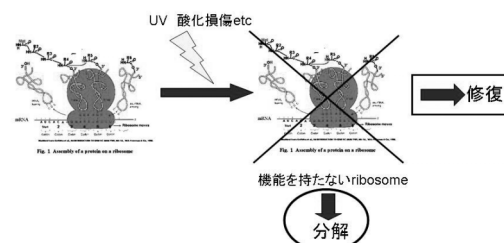


真核生物では、細胞は核膜により細胞核と細胞質という二つの区画に分断化され、多くの遺伝子はイントロンによって分断化されている。高分子化学研究分野の大野睦人教授の研究室では、真核生物固有の細胞構造や遺伝子構造に起因する遺伝子発現機構をRNAをキーワードとして研究している。また、北畠助教を中心に、リボソームの品質管理の研究を行っている。



#### 損傷を負った生体高分子の運命

DNA.....さまざまな経路で修復される  
たんぱく質...修復できるものは修復され、できないものは分解  
RNA.....はつきり分かっていない



2009年には、3月に芳本が卒業し、4月にM1の和泉が入学した。その結果、大野研究室には、秘書（本田）、2人の助教（北畠・谷口）、8人の博士後期課程大学院生（宮田・霧生・鈴木D4、マクローズキー・竹村D3、藤井・藤田D2、坂田D1）、3人の修士課程大学院生（秋石M3、竹岩M2、和泉M1）が在籍することとなった。

#### 1) RNAの細胞内分配制御（谷口・霧生・鈴木・マクローズキー・竹村・秋石・竹岩・和泉）

RNAにも多くの種類が存在し、核内で転写された後、細胞質へと核外輸送されるものと核内の様々なドメインに輸送されるものが存在する。これらRNAの選択的輸送は遺伝子発現のために必須の過程であるが不明な点が多い。この核の中でのRNAの選別はRNA上のどのような目印を識別して行われるのか、またその識別を行う因子はどのようなものなのか？これらの問題を中心にRNAの輸送機構を研究する。

##### 1-1) RNAの核外輸送におけるIDエレメント

核外輸送される主要なRNAには、リボソームRNA(rRNA)、転移RNA(tRNA)、ウリジンに富む核内低分子RNA(U snRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)などが挙げられるが、これらのRNAはそれぞれのRNA種に固有の輸送因子群によって核内で結合された後、細胞質へと輸送される。興味深い

事に、核内でそれぞれの RNA に結合する因子群は、核外輸送を司るだけでなく、核外輸送後のそれぞれの RNA の運命(細胞質における RNA の輸送・局在化、翻訳、RNA の安定性、など)をも規定することが明らかになってきた。つまり、異なる種類の RNA は核内で既に核外輸送因子群によって識別されていて、その識別がこれら様々な RNA の運命全体に影響を与えるのである。我々は、特に mRNA に焦点を絞り、核内で mRNA が mRNA として識別される特徴(mRNA の ID エlement)の全貌を解明し、さらにそれらの ID エlementを識別するトランス因子群を明らかにすることを目指している。

現在までに、1. RNA がイントロンを持ちそれがスプライシングにより除去される事、あるいは、2. RNA が強固な二次構造を取らない約 300 塩基長以上の RNA 領域を持っている事、3. ポリ A の尾を持つことの 3 つの特徴が mRNA の ID として機能する事を明らかにしてきた。

#### 1-2) RNA の長さが検知される機構

上の 2 の結果は、細胞の中の何らかのタンパク質因子が、核外輸送の際に RNA の長さを検知している事を強く示唆している。この現象を再現する試験管内の系をつくり、長い RNA 上に mRNA 核外輸送因子を優先的に結合させる機構に迫ろうとしている。2009 年は、長い RNA 上から、U snRNA の輸送因子 PHAX を解離させる活性を精製し、その実体に迫ることを試みている。また、この精製の過程で、短い RNA への PHAX の結合を増強する別の活性を同定し、その実体の同定も試みている。

#### 1-3) mRNA 前駆体の核内保持機構

一般に、イントロンが除かれる前の RNA (mRNA 前駆体)はスプライシングが終わるまで核の中に留められていて細胞質に現れることはない。これは、間違ったタンパク質の情報を細胞質に伝えないという RNA の品質管理機構のひとつである。この機構は重要であるにもかかわらずほとんど明らかになっていない。変異解析の結果、アフリカツメガエルの卵母細胞内では、3' スプライシング信号が最重要であるという結果を得た。それに結合する U2AF という因子が既に同定されているので、U2AF が関与するというデータを現在取得中。また、哺乳類培養細胞でも、因子のノックダウン法や RNA への因子の tethering 法によって、mRNA 前駆体の核内保持に関与する配列、トランス因子候補を別途探索している。

### 2) リボソームの品質管理機構 (北畠・宮田・藤井・坂田)

真核細胞のリボソームは 4 種類の rRNA と 80 種類のリボソームタンパク質からなる巨大 RNP 複合体である。この巨大複合体が遺伝子突然変異やストレスによって機能を失ったら、細胞はそれをどう処理するのだろうか? rRNA とリボソームタンパク質の両面からこの問題に挑み、新規な RNP の品質管理機構を探ろうとしている。損傷を負ったリボソーム RNA は、選択的に分解される経路と、修復を行う経路の両方により品質管理を受けることが分かってきた。今年は選択的分解経路について、以下のような成果を得た。

遺伝子の変異や転写時の誤りにより、細胞内では機能不全 RNA が合成されることがある。また正



しく合成された RNA にも、紫外線や薬剤、内在的に発生する活性酸素など、さまざまなストレスにより損傷が導入されることがこれまでに報告されている。このようなさまざまな要因により細胞内には機能不全 RNA が生成するが、真核生物においてはこれらの機能不全 RNA を選択的に分解する品質管理機構が存在し、細胞内の秩序を維持していることが分かっている。

過去の研究から、mRNA や tRNA について、機能不全型の RNA を選択的に除去する巧妙な仕組みが明らかになってきている。しかし細胞内の 80%の容量を占めるリボソーム RNA の品質がどのように維持されているのかはよく分かっていなかった。

当研究室では出芽酵母を用いて、機能不全 rRNA を含んだリボソームが選択的に分解されることを見出した。この分解には、これまで DNA の修復に必要とされたと考えられてきたユビキチンリガーゼ複合体の構成因子、Mms1 と Rtt101 の両者が必要だった。リボソームを精製して解析すると、機能不全 rRNA が存在するリボソームに限り、Mms1 と Rtt101 依存的にたんぱく質のユビキチン化が起こることが明らかになった。このことは、変性して機能を失ったたんぱく質がユビキチン化されて分解されるのと同様に、rRNA の損傷により機能不全となったリボソームもその分解に先立ってユビキチン化を受ける、ということを示している。

今回の研究から、Mms1 と Rtt101 を含む複合体が DNA 損傷修復だけでなく、rRNA の品質管理にも必要とされることが明らかになった。過去の報告から、この複合体が dNTP の濃度調整や、レトロトランスポゾン Ty1 の増幅抑制にも役立っていることが示唆されている。これらは一見互いに関係のない経路のように見えるが、どれも DNA に損傷が起こるストレス状態（**Genotoxic stress**）で働くという共通点がある。そのようなストレス条件では DNA 同様 RNA にも損傷が起こる。そのため機能不全 rRNA を除去する必要があるのだろう。このような意味合いから当研究室では、Mms1 と Rtt101 を含むユビキチンリガーゼ複合体を、「Guard 複合体」と命名した（**Genotoxic stress related Ubiquitin ligase associated with RNA and DNA damage**）。

当グループでは大森（准教授）、花房（教務補佐員）、佐々木（技術補佐員）と森下（技術補佐員）と4人から成り、2009年中の移動は全く無かった

分子生物学におけるセントラルドグマは「遺伝情報はDNAからRNA、そしてタンパク質へと伝えられる」ということであった。しかし、RNAを鋳型にしてDNAを合成する逆転写酵素の発見により、必ずしも全てがその通りではなく、例外も存在することが明らかになった。一方、構造生物学におけるセントラルドグマは「タンパク質は一定の折り畳まれた構造(folded structure)を取ることであり、その機能を発揮する」というものであった。科学雑誌では色彩豊かに装飾されたタンパク質の高次構造についての論文が多く、またテレビのコマーシャルにおいても分子標的として開発された薬剤が「鍵と鍵穴」式にターゲットに結合して阻害効果をもたらすとコンピューターグラフィックスの動画を目にすると、いかにも”post-genome era”の研究方向を示唆しているように感じられる。しかし、最近では”Intrinsically Unfolded Proteins”（以下、IUPs と略す）が多く存在し、eukaryotes においてはむしろ多数を占めることが明らかになりつつある。IUPs は別名”naturally unfolded (unstructured or disordered) proteins”とも呼ばれるので、日本語訳としては「天然変性タンパク質」とされることが多い。しかし、この「天然変性タンパク質」を再度英語に直そうとすると”naturally denatured proteins”ということになり、「本来的にしっかりとした構造を取らない」という性質を持つという意味が伝わってこない。大腸菌のタンパク質はその一部を決失させると全ての活性が失われることが多いのに対して、高等真核生物のタンパク質の場合は部分構造だけでも何らかの活性を保持していることが多いのは、高等真核生物の遺伝子は数多くの exon から成っているとその産物もまた幾つかの部分構造から構成されるためであろうと解釈されてきた。コンピューター予測から、我々の研究してきたヒトの DNA polymerase  $\kappa$  (Polk) の N 末端側半分は catalytic domain としてしっかりとした構造を取るのに対して、その C 末端側半分の大部分が unstructured であると推定される。むしろ、Polk などの DNA 損傷のバイパス合成に関わる酵素は catalytic domain を含めて柔軟な構造を取ることによってその機能を発揮すると考えられる。

Polk の全長 870 アミノ酸のうち、N 末端側半分は大腸菌ホモログである DinB polymerase と高い相同性を持つが、C 末端側半分は他のタンパク質との相互作用に関わる domain や motif を含んでいる。多くの DNA polymerase は DNA 合成の途中で基質である二本鎖 DNA の一方の鎖のプライマー末端から離れないように PCNA と呼ばれるタンパク質と結合する。Polk も C 末端近傍に PCNA-Interacting Protein (PIP)-box と呼ばれる配列を持っている。PCNA は homotrimer としてドーナツのような形になって、その空洞部分に二本鎖 DNA を取り込むようにして結合する。通常の複製型 DNA polymerase は鋳型 DNA 上の損傷部位に遭遇するとそこで進行を停止し、それに結合していた PCNA は mono-ubiquitin(mUb)化を受けると考えられている。Polk のように DNA 損傷のバイパス合成に関わる Y-family の DNA polymerase は Ubiquitin-Binding Domain (UBD) を 1 ～ 2 コピー持って

おり、mUb 化を受けた PCNA に結合して進行停止に陥った複製型 DNA polymerase に置き換わると考えられている。また、Polk は PCNA や同じ Y-family に属する REV1 とも相互作用するが、そのためのモチーフ配列 (REV1-Interacting Region, RIR) はせいぜい 10 アミノ酸ほどの短いものである。コンピュータ予測では、Polk の C 末端側半分では二つ存在する UBD (Zinc-finger motif を持つことから UBZ と呼ばれる) の部分だけがしっかりとした構造を取り、その他は disordered であると推測される。他のタンパク質とも相互作用する場合、きちんとした高次構造を取ることが必要な場合もあるが、そのような場合には構造維持のために多くのアミノ酸残基が使われることになる。一方、短いモチーフ配列の場合には高次構造は必要ではなく、アミノ酸配列が長くなる分だけ相互作用するパートナーの数は増えることになる。弱い結合を通じて、短時間に色んなパートナーを相互作用するような場合にはモチーフ配列を利用する方が好都合である。

一般に DNA polymerases は *tomb*, *fingers*, *palm* からなる「右手様」構造を取ると考えられて来たが、最近の研究によって Polk の catalytic domain は単独ではそのような構造を取っておらず、DNA と結合することによって二本鎖 DNA のプライマー末端部分に取り囲むような構造になることが分かった。この場合、二本鎖 DNA は娘鎖の塩基配列を指定する template としてばかりでなく、Polk の高次構造をも規定する「枠組み」あるいは「鋳型」としても働くと言える。DNA 損傷は大きさや構造も様々に異なるので、それらに対処するためには一つの固定した構造を取り、それに適合したものだけに結合して機能するよりも、むしろ損傷の構造に応じて構造を変えるという柔軟性を持つ方が確かに遥かに有効であると考えられる。こうして、「タンパク質は特定の折り畳まれた構造 (folded structure) を取ることで、その機能を発揮する」というドグマから解放されることによって、新しい視界が開けたという意味では実り多い年であった。

今年は 2009 年 3 月に技術補佐員の今井久美子が退職し、生命科学研究科修士課程 2 年の戸田嗣人、角知代、中村弘毅、猪野友理子、和田裕之、研究生の白潔が新たな道を歩み始めた。4 月には教務補佐員として坂部朋美が参加した。さらに、梁冰霏が医学研究科博士課程に、阿部昌史が生命科学研究科修士課程に入学した。このような推移で、生体防御研究分野は現在、教授 1 名、助教 3 名、大学院生 2 名、技術職員 1 名、技術補佐員 1 名、秘書 1 名の総勢 9 名となっている。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の細胞系列決定と初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン 7 (IL-7) とそのレセプター (IL-7R) を切り口に、転写制御やクロマチン構造変換など、エピジェネティクスの観点から解析している。

#### (1) STAT5 による TCR $\gamma$ エンハンサーの活性化

これまで我々は、IL-7R によって活性化された STAT5 が J $\gamma$  プロモーターに結合し、ヒストンアセチル化を誘導することで J $\gamma$  遺伝子の accessibility を上昇させることを報告してきた。一方、TCR $\gamma$  遺伝子座では、STAT5 の結合モチーフが J $\gamma$  プロモーターのみならず 3' エンハンサー (E $\gamma$ ) にも保存されていることから、STAT5 が E $\gamma$  と結合してその活性を制御している可能性が考えられる。初期胸腺細胞において E $\gamma$  の H3 ヒストンの 4 番目のリジン残基が高レベルにメチル化されており、IL-7R $\alpha$  ノックアウト (KO) マウスでは低下していた。また、STAT5 がサイトカイン刺激により E $\gamma$  に結合しアセチル化を上昇させた。一方、転写因子 Runx と c-Myb が恒常的に E $\gamma$  に結合していた。さらに、STAT5 は Runx や c-Myb と協調して E $\gamma$  のエンハンサー活性を上昇させた。以上の結果から、TCR $\gamma$  遺伝子座のエンハンサーには、まず Runx や c-Myb が、続いて STAT5 が結合し、段階的に活性化することが明らかとなった。また、STAT5 は J $\gamma$  プロモーターだけでなく E $\gamma$  にも結合し、TCR $\gamma$  遺伝子座の germline 転写と accessibility を制御していることが示唆された。(谷一靖江、生田宏一)

#### (2) STAT5 による TCR V $\gamma$ 領域の制御

IL-7R $\alpha$  ノックアウトマウスでは、J $\gamma$  遺伝子だけでなく V $\gamma$  遺伝子の germline 転写も低下している。また、TCR $\gamma$  遺伝子座では、STAT5 の結合モチーフが J $\gamma$  プロモーターのみならず V $\gamma$  領域内の制御領域 HsA にも保存されている。以上のことから、IL-7R シグナルにより STAT5 が HsA と結合して V $\gamma$  領域のクロマチンを制御している可能性が示唆される。まず、RAG-2 KO マウス胸腺細胞では、V $\gamma$ 5、V $\gamma$ 2、HsA のヒストンアセチル化のレベルが高く、IL-7R $\alpha$  KO マウスでは低下していた。また、サイトカイン依存性細胞株 Ba/F3 細胞において、サイトカイン刺激により V $\gamma$ 5 と HsA のヒストンアセチル化と germline 転写が上昇した。さらに、この時 V $\gamma$ 5 のクロマチン accessibility も上昇していた。また、RAG-2 KO マウス胸腺細胞やプレ T 細胞株 Scid.adh を IL-7 で刺激すると、STAT5 が HsA にリクルートされた。一方、STAT5 は V $\gamma$ 5 プロモーターには結合しなかったし、

V $\gamma$ 5 プロモーターを直接活性化することはなかった。以上の結果から、STAT5 が HsA に直接結合しヒストンアセチル化を誘導する一方、V $\gamma$ 5 プロモーターは間接的に活性化することが示唆された。（谷一靖江、生田宏一）

### （３）IL-7R は CD8 T 細胞の分化と末梢 T 細胞の維持を制御する

IL-7R はリンパ球の分化と維持に重要な働きをしている。IL-7R $\alpha$  KO マウスでは $\alpha\beta$  T 細胞が劇的に減少し、 $\gamma\delta$  T 細胞は完全に欠失する。しかし、T 細胞分化の後期における IL-7R の役割については詳しく解析されていない。この問題を明らかにするために、我々は第 2 エクソンの両側に loxP 配列を挿入した IL-7R $\alpha$ -floxed マウスを作製し、Cre 組換え酵素を胸腺 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>段階から発現する CD4-Cre トランスジェニック (Tg) マウスと交配してコンディショナル KO マウスを得た。その結果、CD4-Cre x IL-7R $\alpha$ <sup>flox/flox</sup> マウスでは、胸腺の全細胞数は変化しないが、mature CD8 single positive (SP) 細胞の細胞数が著明に減少した。末梢では、リンパ節やパイエル板の数は変化がなかったが、CD4 T 細胞と CD8 T 細胞が減少し、 $\gamma\delta$  T 細胞が増加していた。これらの結果から、IL-7R が CD8 T 細胞の分化と末梢の CD4 T 細胞と CD8 T 細胞の維持を制御することが明らかとなった。（谷一靖江、阿部昌史、生田宏一）

### （４）リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布

IL-7 は胸腺や骨髄のストローマ細胞や上皮細胞が産生するサイトカインであり、リンパ球の増殖・生存・分化・成熟に不可欠である。しかしながら、リンパ組織における IL-7 産生細胞の分布と機能については不明の点が多い。我々は、この問題を明らかにするために、IL-7-GFP knock-in マウスを作製した。IL-7-GFP マウスでは骨髄ストローマ細胞、胸腺上皮細胞、腸管上皮細胞とともに、リンパ節やパイエル板の T 細胞領域ストローマ細胞やリンパ管内皮細胞で GFP が発現していた。したがって、IL-7-GFP マウスによりこれまで報告されていなかった IL-7 産生細胞が明らかになった。（原崇裕、谷一靖江、生田宏一）

### （５）胸腺と皮膚の上皮細胞によって産生される IL-7 の局所における機能

IL-7 は皮膚・腸管・胸腺の上皮細胞、骨髄・胸腺の間葉系ストローマ細胞、そして脾臓とリンパ節の細網細胞によって産生される。しかし、それぞれの細胞が産生する IL-7 の局所における役割についてはほとんどわかっていない。この問題を明らかにするために、我々は第 4 エクソンの両側に loxP 配列を挿入した IL-7-floxed マウスを作製した。このマウスを FoxN1-Cre と keratin 5-Cre Tg マウスと交配し、それぞれ胸腺と皮膚の上皮細胞でのみ IL-7 を欠損したコンディショナル KO マウスを得た。FoxN1-Cre x IL-7<sup>flox/flox</sup> マウスでは胸腺の全細胞数と $\gamma\delta$  T 細胞数が 1/15 に減少した。この結果から、胸腺上皮細胞が産生する IL-7 が胸腺細胞の増幅と生存に大きなはたらきをしていることが明らかとなった。一方、keratin 5-Cre x IL-7<sup>flox/flox</sup> マウスでは皮膚の上皮内 $\gamma\delta$  T 細胞は変化しなかったことから、皮膚の上皮細胞が産生する IL-7 は $\gamma\delta$  T 細胞の維持に必須ではないことが明らかとなった。（原崇裕、梁冰霏、谷一靖江、生田宏一）

#### （６）膀胱癌マーカーとしての尿中カルレティキュリンの検出

カルレティキュリン（CRT）は、分子量 40 KD の蛋白質として尿路系器官に広く見られる。膀胱癌の組織においては、スプライスされていない形の分子量 55 KD の蛋白質が発現されていることを、私達はすでに報告している。この 55 KD CRT は患者尿中にも見られ、尿路系癌の良いマーカーであると考えられる。55 KD CRT を免疫したマウスの脾細胞をミエローマ細胞と融合し、55 KD CRT と特異的に反応する抗体産生細胞を作成した。多くの IgM 産生細胞を廃棄し、7 クローンの IgG 産生細胞を得た。その内 2 クローンは、遺伝子産物全長である 55 KD CRT とのみ反応することが分かった。残りの 5 クローンは、全長の 55 KD CRT およびスプライスされた形の 40 KD CRT の両方に反応した。現在、これらの抗体の適切な組み合わせを用いた癌患者尿中の全長 CRT を検出するシステムを構築中である。（上田正道）

本年度は4月から、生命科学研究科修士課程に Dorys Adriana Lopez、秘書に吉田沙耶、共同研究者として杉江勝治（次年度客員准教授予定）が参加した。現在、感染防御分野では教授、准教授、助教以外に研究員5名、技術補佐員2名、大学院生6名、秘書1名の総勢17名で研究を行っている。

感染防御分野では、1980年代にヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）感染細胞株から単離したヒトチオレドキシン1（human-Thioredoxin1; hTRX1）、およびそのファミリー分子・関連分子を中心に、酸化還元（レドックス）制御機構とストレスシグナルの研究を行っている。加えて、酸化ストレスに深く関与する疾患として、ウイルス感染症、癌、糖尿病、メタボリックシンドロームなどの病態解析も行っている。

### 1) TRX

TRX は-Cys-Gly-Pro-Cys-を活性部位とする酸化還元調節タンパク質である。TRX は種を超えて保存されており、1960年代に大腸菌においてリボヌクレオチド還元酵素の補酵素として発見され、ヒトの TRX は1980年代に単離した。TRX はペルオキシレドキシン (Peroxiredoxin; Prx) と共役して活性酸素種を消去する抗酸化タンパク質として働くほか、タンパク質の酸化還元（Oxidation-Reduction、レドックス）を調節することで細胞内におけるシグナル伝達機構を制御するレドックス制御分子として働くことが知られている。本年度はさらに、hTRX1 のノックダウンによって、ERK/MAP キナーゼ/AP-1 経路を介して細胞周期が G1 期で停止することを報告した。

### 2) Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2)

TRX の結合蛋白質として当研究室で同定した TBP-2 は還元型チオレドキシンと選択的に結合し、その活性を抑制する働きを持つことを報告した。TBP-2 の発現は酸化ストレスや血清飢餓、高グルコース負荷などにおいて転写レベルで発現が亢進することが知られており、HDAC 阻害剤 (histone deacetylase inhibitor) や PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) のリガンドなどの薬剤によっても誘導されるストレス誘導性の因子である。多くの癌細胞において、TBP-2 の発現が顕著に減少していることが知られており、さらに TBP-2 の過剰発現により、細胞増殖が抑制される。また TBP-2 は HTLV-1 感染細胞株においても DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化によりその発現がサイレンシングされていることが明らかになった。これらのことから、TBP-2 は細胞増殖制御、癌抑制因子としての機能を持つと考えられる。当研究室で作製した TBP-2 遺伝子欠損 (TBP-2<sup>-/-</sup>) マウスは絶食時に高脂血症、低血糖、高インスリン血症を示し、絶食に対して抵抗性がなくなることを見いだした。また TBP-2<sup>-/-</sup>マウスは耐糖能が亢進し、糖に対するインスリン分泌能、インスリンに対する糖取り込み能が高いことを最近報告した。このように TBP-2 を中心としたレドックス制御機構が糖・脂質代謝制御および代謝疾患において重要な働きを持つことを明らかにした。

### 3) Transmembrane Thioredoxin-related Protein (TMX)

TMXは2001年に松尾らによってヒト肺癌細胞 (A549) から TGF- $\beta$  反応性の遺伝子として同定された、小胞体膜上に存在する膜貫通型の TRX ファミリー分子である。小胞体には TRX ファミリー分子が多数存在しており、その1つである TMX は小胞体ストレスを緩和させることで、アポトーシスを抑制していることが報告されている。タンパク質間相互作用解析の結果、TMX は主に膜タンパク質を標的とした酸化還元酵素として小胞体のタンパク質合成の品質管理に働く可能性が示唆された。現在、TMX 遺伝子欠損マウスを作成し、小胞体の機能不全が原因とされる病態や酸化ストレスの関与する病態において、TMX の果たす役割について解析を行っている。

### 4) TRX 誘導・高含有機能性食品の開発

TRX は細胞内抗酸化物であり、様々なストレスに対する生体防御機能が期待されている。経済産業省「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発／植物利用高付加価値物 製造基盤技術開発」(H18-H22 年度；「医・農・工融合によるヒトチオレドキシン1 産生レタスの生産技術の開発」) では、奈良先端科学技術大学院大学との共同研究により、遺伝子組み換え技術によるレタス産生 hTRX1 の生産の検討を行い、現在、応用のための機能解析を進めている。

### 5) 臨床応用を目指した TRX 創薬

TRX トランスジェニックマウスは種々の酸化ストレスに抵抗性を示すほか、対照マウスより長寿傾向を示す。また、インフルエンザウイルス感染、リステリア感染や、ブレオマイシン、高サイトカイン血症、急性肝炎による障害に抵抗性を示す所見が得られている。現在、TRX および関連分子の抗炎症作用の分子機構の解析を進めるとともに、急性肺障害や慢性閉塞性肺疾患の病態の解明のために、喫煙曝露動物モデルなどを用いての基礎的検討も行っている。医薬基盤研究所受託研究プロジェクト「チオレドキシンによる急性呼吸器疾患新規治療法の開発」(H18-H22 年度) においては、急性呼吸促迫症候群、急性肺障害を対象として、hTRX1 蛋白製剤を用いた医師主導治験の準備を進め、さらに TRX の臨床応用を目指している。



本年度は、4月に濱崎真弓さんが生命科学研究科 D1 として、井川敬介くんが生命科学研究科 M1 として新たに参加し、総勢5人でスタートしました。当分野では、細胞増殖について、細胞分裂軸の方向を決めるメカニズム、分裂と代謝の連携、増殖と膜輸送の関連との観点から研究を進めています。

#### (1) 細胞分裂軸制御に関わるキナーゼの網羅的スクリーニング

ヒト培養細胞である HeLa 細胞は、フィブロネクチンなどの細胞外基質の上で培養すると、インテグリン依存的に細胞分裂軸を基質面に対して水平に配置する機構を持つ。これにより娘細胞の基質への接着を保証している。近年、 $\beta$  1 インテグリンがマウス皮膚の表皮基底細胞での分裂軸方向の制御に重要であることが報告されたが、その分子機構はわかっていない。そこで、我々が報告した HeLa 細胞での細胞分裂軸方向の解析システムを利用しスクリーニングを行うことにした。キナーゼとその関連遺伝子を含むヒトの 719 遺伝子に対する siRNA ライブラリを用い、網羅的に遺伝子発現を HeLa 細胞で抑制し、分裂軸方向に対する影響を調べた。一次スクリーニングでは、各細胞の紡錘体軸の傾きを目視によって3段階評価し、31 遺伝子を候補として得た。二次スクリーニングでは、細胞の接着面と紡錘体軸との為す角度の数値を計測した。この為 Z 軸方向に連続撮影した画像から紡錘体の2極を自動的に割り出し、紡錘体の傾きを自動的に計算する画像解析ソフトを新たに開発した。このソフトを用いて定量的に絞り込んだ結果、1 次スクリーニングで得た 31 遺伝子のうち5つの遺伝子に絞りこんだ。このひとつはチロシンキナーゼであり、阻害剤も既に存在したことからさらなる解析を行った。siRNA による抑制によって分裂軸がランダムになってしまうが、mouse cDNA を用いて add back を行うと分裂軸がまた水平になる、即ちレスキューされたことから、確かに分裂軸方向を制御する新たな遺伝子が見出されたことがわかった。さらには、阻害剤処理によっても分裂方向がランダムになったことからキナーゼ活性が重要であることが示唆される。このチロシンキナーゼのキナーゼ活性は細胞周期依存的に変動し分裂期に最大となり、キナーゼ活性と分裂軸の方向制御のタイミングが一致することがわかった。また、ヒト培養角化細胞である HaCat を用いた3次元培養皮膚の系においても、阻害剤処理によって多層化・角化に異常をきたすことがわかった。阻害剤のマウスへの投薬により、皮膚基底層での細胞分裂軸方向にも異常が生じることを見出した。現在、この分子機構の解明を試みている（松村）。

#### (2) コレステロールと細胞分裂

生体膜は、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールなど多種類の脂質から構成される。我々は、これまでに、細胞膜上のホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 PI(3, 4, 5)P3 がインテグリンを介した細胞—基質間接着に依存する細胞分裂軸制御機構において、必須の役割を果たすことを見出した。本年度は、細胞分裂期におけるコレステロールの役割について、HeLa 細胞を用いて検討を行った。methyl- $\beta$ -cyclodextrin の添加によりコレステロール除去すると、多極化した

紡錘体をもつ細胞の割合が顕著に増加した。さらに、コレステロール合成に必須の squalene synthase や、細胞外からのコレステロールの供給を司る LDL receptor の発現を siRNA によりノックダウンした場合でも同様の異常が観察された。これらの結果は、コレステロールが細胞分裂期において紡錘体形成を制御することを示唆している。現在、コレステロール代謝物の関与について検討を行っている（濱崎）。

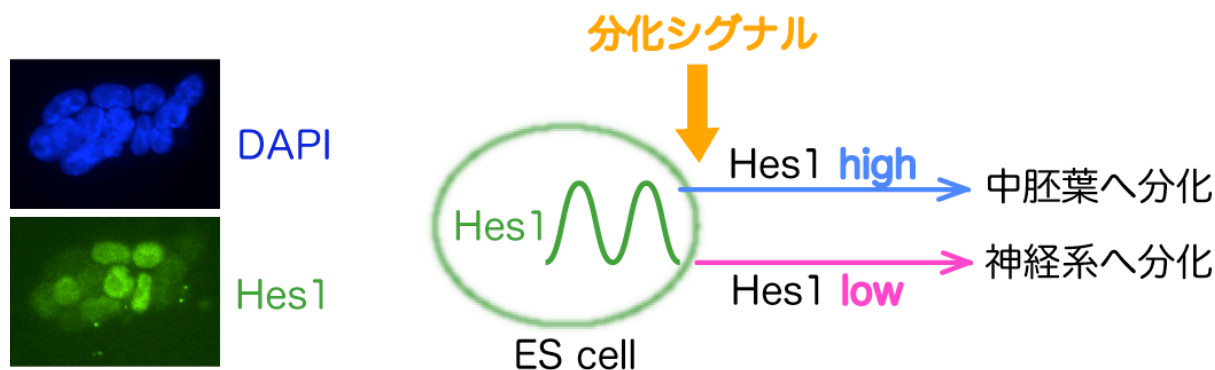
### （３）分裂期制御因子によるインテグリントラフィックの制御

細胞-基質間接着を担うインテグリンは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リサイクリングエンドソームを介して細胞膜へとリサイクルされる。このインテグリンの輸送機構は、癌細胞の浸潤や細胞運動に重要であることが知られているが、その分子機構は不明な点が多い。我々は、分裂期制御因子として知られるキナーゼがインテグリンの細胞内輸送を制御する知見を得た。細胞をこのキナーゼに対する阻害剤で処理したところ細胞内でのインテグリン小胞が肥大化する現象が認められた。また、インテグリン抗体を取り込ませることで細胞内のインテグリン小胞を特異的に観察したところ、このキナーゼを siRNA でノックダウンした細胞ではインテグリン小胞の形態に変化が認められた。現在このキナーゼのインテグリン輸送における作用点と細胞運動への関与について検証を行っている（井川）。

当研究室には、平成 21 年 4 月から医学研究科修士課程 1 年の渡邊直希が入学し、また、磯村彰宏がポスドクとして、松本真美がテクニシャンとして加わった。8 月からは Iris Manosalva も加わった。さらに、12 月から松田孝彦がさがけ研究員としてハーバード大学から赴任した。今吉格もさがけ研究員として研究を続けることになった。一方、生命科学研究科博士課程の高嶋良樹と生命科学研究科修士課程の水野浩彰は 4 月から就職し、医学研究科博士課程の上尾太郎と北川雅史は臨床にもどった。影山は、4 月はスイス・アスコナ、5 月はロンドン、6 月はバルセロナとロンドン、9 月はアテネの国際シンポジウムで招待講演を行った。今吉格は 3 月に米国タホで開催されたキーストンシンポジウムにおいて、丹羽康貴は 9 月に英国エジンバラで開催された国際発生生物学会大会において発表を行った。その他、教室員の多くが、発生生物学会（新潟）、神経科学会（名古屋）、生化学会（神戸）、分子生物学会（横浜）等の国内学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生過程を転写因子レベルで明らかにするというもので、特に、塩基性領域-ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ因子(bHLH 因子)に注目している。bHLH 因子 Hes1 や Hes7 は 2 時間周期の生物時計として機能するが、その分子機構や役割については不明の点が多く、今後さらに解析する予定である。

本年は、以下に記すようにいくつかの重要な研究成果をあげることができた。そのうち、小林妙子が発表した Hes1 に関する論文は、再生医療への応用が期待され、多くの新聞で紹介された（下図）。



図：ES 細胞の多様な分化応答に Hes1 オシレーションが寄与。ES 細胞では Hes1 の発現が 3 ～ 5 時間周期でオシレーションしているため、細胞間で Hes1 の発現レベルがばらついている（左図）。分化誘導したときに、Hes1 の発現レベルが高いと中胚葉系に分化しやすいが、Hes1 の発現レベルが低いと神経系に分化しやすい（右図）。したがって、Hes1 の発現オシレーションは、ES 細胞の多様な分化応答性に寄与する。

### (1) 振動遺伝子 Hes1 が胚性幹細胞の多様な分化応答に寄与する

胚性幹(ES)細胞は多分化能をもち、再生医療への応用が期待されているが、分化誘導に対して応答は多様で、細胞間でばらついている。そのため、均一な細胞群が得られず、再生医療への応用にとって障害となっている。ES 細胞がなぜ細胞間で異なる分化応答を示すのか、そのメカニズムは全く分かっていなかった。我々は、マウス ES 細胞内で、転写因子 Hes1 並びに Hes1 が制御する下流遺伝子の発現が振動していることを見いだした。また、Hes1 タンパク質の発現レベルが低い ES 細胞はより神経系に分化しやすく、発現レベルが高い ES 細胞はより中胚葉系に分化しやすいことが分かった。さらに、Hes1 ノックアウト ES 細胞は、より均一にかつ早期に神経系に分化することを見いだした。以上の結果から、Hes1 の発現振動は、同じ環境下であっても不均一な細胞応答を作り出すメカニズムの一つであることが明らかになった。(小林妙子)

### (2) 分節時計の数理モデルの構築

体節は、胎児に一過性に形成される節状の構造物で、椎骨、肋骨、骨格筋等のもとになる。体節は、尾部にある未分節中胚葉の前側が周期的に切れる(分節)ことによって左右一対ずつ形成される。この周期的な分節は、未分節中胚葉において Hes7 の発現がオシレーションすること、および後端から前側に向かって減少する Fgf 勾配によって制御される。Hes7 あるいは Fgf 勾配のどちらかに異常が起こっても、体節が分節せずに癒合する。これらの実験結果を取り入れた数理モデルを構築した。この数理モデルは微分方程式から構成され、このモデルからネガティブフィードバックによってオシレーションが起こるのか、定常状態になるのかの分かれ目の条件(Hopf bifurcation)が示唆された。その結果、Fgf 勾配によって、未分節中胚葉の後ろ側では Hes7 の発現オシレーションは持続するが、前側では減弱して定常状態に向かうこと、Notch シグナルは単独では Hes7 の発現オシレーションを維持できないが、前側での減弱を遅くすることが示唆された。(Aitor Gonzalez)

### (3) 網膜において Sonic hedgehog は Notch に依存せずに Hes1 の発現を誘導して前駆細胞の増殖を維持する

Sonic hedgehog (Shh)は中枢神経系において幹細胞や前駆細胞の増殖に重要な役割を担うが、その下流の分子機構については不明の点が多い。網膜細胞をモデル系として Shh の下流ではたらく分子を解析したところ、まず Shh によって転写因子 Gli2 が活性化され、引き続き、幹細胞や前駆細胞の増殖・維持に重要な役割を担う転写因子 Hes1 の発現が誘導された。この Hes1 の発現誘導は、Notch シグナルに依存しなかった。また、免疫沈降法の実験から Gli2 蛋白は Hes1 遺伝子プロモーターに直接結合することがわかった。さらに、Gli2 あるいは Hes1 を欠損すると Shh による幹細胞や前駆細胞の増殖誘導がおこらなくなった。以上の結果から、Shh は Notch に依存せずに Hes1 の発現を誘導して前駆細胞の増殖を維持することが明らかになった。(Wallace 博士との共同研究)

### (4) Notch-Hes1 経路は p27Kip1 の発現を低下させることによって蝸牛前神経野の形成を制御

内耳の発生において、Notch シグナルは側方抑制を介して有毛細胞と支持細胞の分化に重要な役

割を担う。このとき、Notch のリガンドとして Deltalike1 や Jagged2 が、Notch の下流分子として Hes1 や Hes5 がはたらく。最近、内耳発生のもっと早期においては、Notch のリガンド Jagged1 が発現して前神経野の領域を決定する。このとき、前神経野の細胞では p27Kip1 の発現が増えて細胞分裂が停止するが、Notch シグナルの下流でどの因子がはたらくのか不明であった。そこで、発現解析を行ったところ、前神経野では Hes1 は発現していたが、Hes5 の発現は見られなかった。さらに、Hes1 ノックアウトマウスでは、p27Kip1 の発現が増え、細胞増殖が減少していた。以上の結果から、Notch-Hes1 経路は p27Kip1 の発現を低下させることによって蝸牛前神経野の形成を制御することが明らかになった。(村田博士との共同研究)

#### (5)自然界から得られた Hes1 ダイマー形成阻害剤

Hes1 ダイマー形成を阻害する物質をスクリーニングする系を開発した。これは、Hes1 蛋白を固定化したマイクロプレートに蛍光標識 Hes1 蛋白を加えるもので、Hes1 蛋白がダイマーを形成すると、洗浄後もマイクロプレートに標識が残った。しかし、Hes1 蛋白のダイマー形成阻害剤が存在すれば、マイクロプレートに残る標識量が減少した。この系を用いたスクリーニングの結果、いくつかの Hes1 ダイマー形成阻害剤を同定した。そのうち、Myxomycetes から精製した2種類の物質は、Hes1 の転写抑制作用に対して阻害効果を示した。(荒井博士との共同研究)

#### (6)体節形成過程における遺伝子発現の時空間パターン：非 Turing モデルによる波の伝搬

体節形成など生物の形づくりは、時空間情報の精密な処理を通じて実現されている。これまでの形態形成の数値モデルの多くは、偏微分で記述される空間連続系でパターン形成を調べてきた。その中でも、拡散不安定性によって安定な定常パターンが誘導される Turing パターンは特に精力的に研究されてきた。しかし、連続変数を用いた偏微分方程式系の数値モデルによる定常パターンの数値解析は、細胞という生体組織の最小単位に起因する離散性がパターンに及ぼす影響を正しく評価できないという欠点がある。そこで、本研究では新たに体節形成を模した空間離散の数値モデルに基づき、空間パターンの形成過程を数値シミュレーションによって研究した。本研究では、未分節中胚葉(PSM)の後端にある分節時計、FGF などの濃度勾配、胚の成長、そして PSM 内での遺伝子発現波の伝搬と停止など、実験で観察された要素をモデルに取り込み、数値シミュレーションを行った。その結果、規律正しい空間周期パターンを形成する結果を得、空間連続の系とは全く異なる現象が現れることが確認された。(吉川博士との共同研究)

2009 年 5 月 16 日付で宮沢孝幸が附属新興ウイルス感染症研究センター・病態解明チームから信号伝達学研究分野へ異動するのに伴い、旧病態解明チーム所属の学生、ポスドクおよび秘書はすべて信号伝達学研究分野の所属となった。2009 年 4 月には、ポスドクとして筑波大学大学院人間総合科学研究科博士課程を修了した星野重樹君が加わった。さらに 8 月には、これもポスドクとしてフロリダ大学獣医学部のリサーチアソシエートをしていた佐藤英次君が加わった。2009 年 12 月末時点での構成員は、医学研究科大学院生（博士課程）4 年の庄嶋、同 2 年の仲屋、人間・環境学研究科大学院生（修士課程）2 年の大畑、吉川、秘書の正玄、ポスドクの星野、佐藤、そして私の総勢 8 名である。

我々は現在、異種間臓器移植や再生医療などの新たな医療や、生ワクチンなどの生物学的製剤の製造の際に問題となる動物由来内在性レトロウイルスの研究を主に行っている。また、ガンマレトロウイルスの内在化と種間感染のモデルとしてコアラレトロウイルス (KoRV) を、エイズの動物モデルとしてネコ免疫不全ウイルス (FIV) についての研究も行っている。

#### （１）伴侶動物用の生ワクチン中の感染性内在性レトロウイルス（RD114 ウイルス）

すべての動物のゲノム中には内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus[ERV]) が存在する。ほとんどの ERV は変異が蓄積することにより、ウイルス複製ができなくなっているが、様々な哺乳類で、感染性を有する ERV も見つかっている。本研究で我々は一部のペット用弱毒生ワクチンから感染性を有するネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) を分離した。日本ならびにイギリスで市販されている、犬用ならびに猫用ワクチンから同ウイルスは分離されたが、ウイルスの分離と確認は、日本、イギリスの 2 つの独立した研究室でそれぞれ異なる方法で慎重に行われた。この研究から、動物用ワクチンで現在行われているレトロウイルスの検査方法が不完全であること、そして検査方法の再評価が必要であることが明かとなった。

#### （２）FeLIX 依存性ネコ白血病ウイルスのフォーカスアッセイ

T リンパ球指向性ネコ白血病ウイルス (T-lymphotropic feline leukemia virus[FeLV-T]) はネコに免疫不全を引き起こす。FeLV-T は fusion-defective な変異体（ウイルス粒子は受容体に結合できるが、ウイルス膜と細胞膜の融合が起こらない）であり、感染には FeLIX と呼ばれるコファクターを必要とする。FeLIX 蛋白は内在性のネコ白血病ウイルスのエンベロープ糖蛋白の C 末が欠損している可溶性の蛋白である。FeLIX 蛋白はリン酸のトランスポーターである Pit-1 分子に結合し、FeLV-T の Env 蛋白と相互作用することで、FeLV-T のウイルス膜と細胞膜の融合を誘導する。本研究で我々は、FeLIX 蛋白を持続的に発現する sarcoma 陽性 leukemia 陰性 (S+L-) 細胞を樹立し、QN/FeLIX 細胞と命名した。FeLV-T は親細胞である QN10S 細胞には感染しないが、QN/FeLIX 細胞には感染し、細胞融合をとまなうフォーカスを誘導する。この細胞を用いることで、フォーカスアッセイ法により FeLV-T の感染価の測定が可能となった。さらに我々は FeLIX 蛋白を持続的に発現す

るネコ繊維芽細胞を樹立し、AH/FeLIX 細胞と命名した。FeLV-T は親細胞である AH927 細胞には感染しないが AH/FeLIX 細胞には感染し、細胞融合を伴う細胞変性効果を誘導した。QN/FeLIX 細胞と AH/FeLIX 細胞は、ネコ白血病ウイルス (FeLV) 感染ネコにおいて FeLIX 依存性 FeLV が自然界に存在するか否かを調べるための有用なツールになると考えられた。

(3) ヒトブタ内在性レトロウイルスサブタイプ A 受容体 2 のエピジェネティクスによる転写制御  
ブタからヒトへの異種間臓器移植は、臓器提供者の不足を解消するための最も有効な手段の一つである。しかしながら、すべてのブタがブタ内在性レトロウイルス (PERV) をそのゲノム DNA 中に有し、そのうち PERV サブタイプ A (PERV-A) および B (PERV-B) がヒトの細胞へ感染する可能性を有するため、異種間臓器移植は停滞を余儀なくされている。PERV のヒトへの感染に必要な受容体として、現在までにヒト PERV-A 受容体 1 (HuPAR-1) および 2 (HuPAR-2) が同定されている。PERV-A は HuPAR-2 を介することでより効率的な感染を行うが、諸臓器で発現している HuPAR-1 とは異なり、HuPAR-2 は特に胎盤で多く発現していることが報告されている。HuPAR の特徴を知ることが PERV-A の感染制御を行う上で重要である。そこで、今回我々は HuPAR-2 の転写機構を調べることにした。まず、ヒト胎盤 (P1)、ヒト栄養膜由来細胞株 (BeWo)、およびヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293) での *HuPAR-2* の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて定量したところ、P1 での *HuPAR-2* 発現量は高く、BeWo および HEK293 では P1 の約 1% と極端に抑制されていた。次に、DNA メチル化酵素阻害剤 (5-aza-dC) を用いて HEK293 での *HuPAR-2* の発現量を定量したところ *HuPAR-2* 発現量は 18 倍に増加した。さらに、*in silico* 解析により *HuPAR-2* 転写開始点 (+1) を含む -308 ~ +139 の領域が CpG アイランドであることが明らかとなった。当該領域の DNA メチル化をバイサルファイトシーケンス、転写活性をルシフェラーゼアッセイ、ヒストン修飾 (H3K4 と H3K9 のトリメチル化 (me3)) を ChIP アッセイによりそれぞれ調べたところ、DNA メチル化は P1 では 13% と低メチル化であったのに対し、BeWo (79%) と HEK293 (83%) では高メチル化を示した。また、転写活性はコントロールの約 10 倍を示し、*in vitro* での DNA メチル化によって抑制された。加えて、P1 では H3K4me3 が多かったのに対し、HEK293 では H3K9me3 が多かった。以上より、HuPAR-2 が DNA メチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティクスによる転写制御を受けていることが示唆された。

蝦名博貴が平成 21 年 1 月に米国 NIH より助教に赴任した。芳田剛が平成 21 年 3 月に医学研究科博士課程を修了・学位を取得し、米国 NIH に留学した。平成 21 年 4 月に米国ロッシュ社より医学研究科博士課程に Peter Gee が入学した。

以下の 3 つのテーマについて研究を遂行している。

1) HIV 感染に関わる宿主因子の解析：細胞からの HIV 粒子の遊離を阻害する細胞性分子 BST-2 とその作用を解除させるウイルスアクセサリ蛋白である Vpu の作用機序の解明を試みた(図 1)。まず、BST-2 の HIV-1 遊離阻害作用は、検討した鳥類を含めたすべての種の細胞においてみられることより、種特異的な補助因子の介在はなく、ウイルスに対して直接作用することが強く示唆された(Retrovirology 6, 53, 2009)。次に、BST-2 の作用を解除する Vpu を発現する HIV は、細胞表面上の BST-2 の発現を強力に抑制することにより、効率的なウイルス粒子産生が誘導されることが分かった(図 1)。そこで、Vpu は感染細胞内においてどのように BST-2 に働いているかを明らかにするために、生細胞内での分子間相互作用を解析できる bi-molecular fluorescent complementation (BiFC) を用いた。本方法はそれぞれの候補分子の末端に、蛍光蛋白のアミノ基ペプチド、ならびにカルボシキル基ペプチドを発現する遺伝子を挿入し、細胞内における 2 つの分子の会合作用による発光を検出する実験系であり、会合する細胞内局在ならびにその量を知ることができる。その結果、BST-2 と Vpu は主に細胞内のリサイクリングエンドソームや後期エンドソームで相互作用していること、この会合に必要な BST-2 内の結合ドメインは、細胞膜貫通部位 (TM) にあること、さらに詳細な結合部位と Vpu 分子への感受性獲得に必須のアミノ酸部位を、Vpu に反応性がないアフリカミドリサル BST-2 をヒト型のアミノ酸に置換した種々の変異体を用いて、明らかにした。その結果、Vpu への結合は TM 内のヘリックス内の特定のアミノ酸領域にあること、また、Vpu に対する反応性を付与するのはこの結合領域に加え、別のアミノ酸が必須であることがわかった。

当研究室が開発した cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクター(J. Virol.78, 11352-11359, 2004)、CD63 の N 末端欠損変異体(CD63ΔN)が、CXCR4 のゴルジ体から細胞質膜への移動を特異的に抑制することを見出した (Traffic, 9, 540-558, 2008)。この CXCR4 の移動阻害には、CD63 分子がその N リンク糖鎖を介して結合することが重要であることを見出した (Microbiol. Immunol 53, 629-635, 2009)。

さらに、遺伝学的ならびに蛋白質化学的手法により、新規 HIV 関連宿主因子の探索研究を行っている。現在、その候補分子として解析を行っているのは、サイトカイン、シグナル分子、ユビキチン関連分子、インフラマソーム関連蛋白質などである。(佐藤佳、小林朋子、篠田康彦、渡部匡史、山元誠司、Peter Gee、三沢尚子、蝦名博貴、小柳義夫)



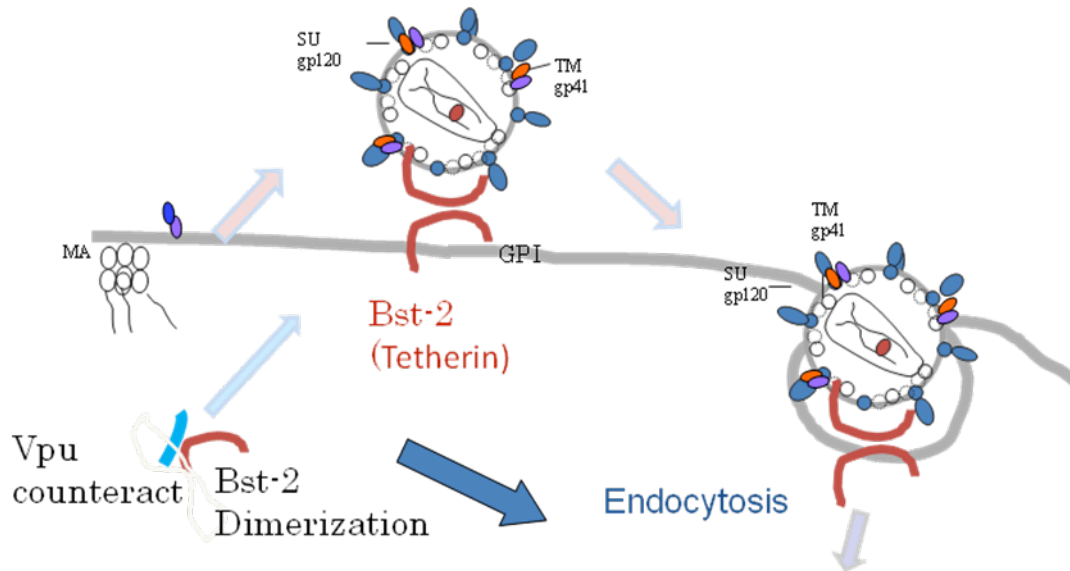


図1. Bst-2はHIV粒子をトラップする

2) HIV 病原性解析 : HIV-1 はその宿主域はヒトとチンパンジーに限られるために、マウスやラットなどへの感染動物実験は不可能であり、ウイルス感染によるエイズの発症メカニズムにはいまだ多くの謎がある。そこで HIV-1 の感染動物モデルとして、ヒト細胞を移植した免疫不全マウス (ヒト化マウス) が作製されてきた。このマウスのひとつとしてヒト血液幹細胞を移植したマウス (NOG-hCD34 マウス) を開発し、生体内におけるウイルス持続産生細胞群の同定とそれに続く HIV-1 の病原性発現様式の解明を目指した。実験動物中央研究所との共同研究により T, B, NK 細胞欠損免疫不全新生児マウスにヒト CD34 陽性細胞を移植し、その後 HIV を接種したマウスを経時的に解析した。その結果、CXCR4 を補受容体とするウイルスである NL4-3 株の感染により、胸腺細胞の死滅と末梢血の CD4 陽性 T 細胞の急速な減少を見出した。一方、CCR5 を補受容体とするウイルス (R5 ウイルス) である JR-CSF 株感染マウスでは、胸腺細胞の死滅は見られないが、末梢血 CD4 陽性 T 細胞の減少、特に CD45RA 陰性メモリー T 細胞の特異的な減少を観察した。そして、脾臓においては HIV-1 p24 陽性細胞、すなわち、ウイルス産生細胞は CD3 陽性 CD4 陰性 CD45RO 陽性 CCR7 陰性のエフェクターメモリー (EM) 細胞であることがわかった。さらに、これら p24 陽性 T 細胞のうち約 70% は Ki67 陽性 EM 分裂細胞であること、一方、明らかに Ki67 陰性の非分裂 EM 細胞においても p24 抗原は検出できた (Virology 394, 64-72, 2009)。これらの結果から、HIV-1 の急性ならびに持続感染者から常に検出される R5 ウイルスは、生体においては EM T 細胞の一部に持続感染していること、そして、その多くは分裂期にあることがわかった。NOG-hCD34 マウスはヒトに特異的に感染するヘルペスウイルスである EBV にも感受性を有する結果を得ており、ヒトウイルス病原性解析モデルとなりうることがわかった。これらの結果は、NOG-hCD34 マウスが、HIV 持続感染モデルならびに抗ウイルス候補薬の評価実験系となりうることを示唆している。(佐藤佳、三沢尚子、小林朋子、小柳義夫)

# Human hematopoietic stem cell-transplantation

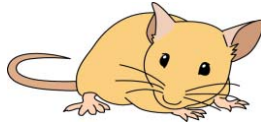


図2. 血液幹細胞移植ヒト化マウス

3) ヘルペス脳炎の発症メカニズム：新生児ラットの脳組織に **GFP 発現 HSV**（東京大学川口博士との共同研究により入手）を感染させると、27%のラットは 48 時間以内にけいれんなどの全脳炎症状を、72 時間以内に体重減少と四肢麻痺などの神経症状を示し、最終的には死亡する。ところが、残りのラットには、一過性の体重減少などの症状から回復健常化する一群があることを見出した。これらのラットの組織解析から、これらの脳組織では、**GFP 陽性のウイルス感染細胞**が限局性に見出されるが、リンパ球やマクロファージ細胞の浸潤などの炎症反応はほとんど見られないことがわかった。この回復ラット内には、何からの内因性の抗ウイルス分子が発現していると想定し、現在マイクロアレイ解析を行い、抗ウイルス候補遺伝子の探索を行っている。（安藤良徳、渡部匡史、Peter Gee、小柳義夫）

### (1) HTLV-1 bZIP factor (HBZ) の HTLV-1 病原性における機能解析

HTLV-1 はヒトの疾患との関連がはじめて示されたレトロウイルスである。造血器腫瘍である成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や HTLV-1 関連脊髄症などを引き起こす。HTLV-1 の pX 領域には、*tax*、*rex*、*p30*、*p12*、*p13*、*HBZ* などの修飾遺伝子がコードされている。その中で *tax* は HTLV-I 感染細胞の不死化に中心的な役割を果たしていると考えられているが、その反面で細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的分子でもあり、ATL 細胞においてはしばしば発現が抑制され宿主免疫を回避している。HBZ は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされ、CREB/ATF ファミリーや c-Jun との相互作用によりウイルス転写を抑制することが知られている。我々は ATL 細胞において Tax の発現はしばしば抑制されているのに対し HBZ mRNA は全ての細胞で発現していることを見出した。HBZ トランスジェニックマウスを用いた解析では、野生型マウスと比較して脾臓中の CD4 陽性細胞が増加していること、胸腺細胞における抗 CD3 抗体に対する反応性が增強していることが明らかとなった。HBZ トランスジェニックマウスは皮膚炎や間質性肺炎を自然発症し、炎症組織では CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認め、HTLV-1 感染者に類似の病態を示すことが分かった。又加齢したマウスにおいて T 細胞性のリンパ腫を高頻度に発症することが分かり、HTLV-1 による T 細胞腫瘍化に重要な働きをしていると考えられる。現在その作用機序の詳細について解析を進めている。

### (2) HBZ 分子と相互作用する宿主側タンパクの同定、及びそのウイルス病原性における意義の検討

我々は yeast two hybrid や種々の細胞内シグナル伝達経路に関する機能的解析を行い HBZ と相互作用する宿主側因子の同定を行っている。そして HBZ が p65 や Tax による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することを見いだした。免疫沈降解析により HBZ と p65 が結合し、p65 の DNA への結合能が低下することを明らかにした。その一方で HBZ がユビキチン依存的な p65 の分解を促進することが判明した。HBZ を発現させた T 細胞株では古典的 NF- $\kappa$ B 経路の標的遺伝子発現抑制を認めた。以上のことから HBZ と p65 の相互作用は Tax による NF- $\kappa$ B の活性化を調節している可能性が示唆された。

### (3) HTLV-I bZIP factor (HBZ) 遺伝子のプロモーター解析

HBZ は HTLV-I のマイナス鎖にコードされるウイルス遺伝子であり、その転写開始点は 3' LTR に存在する。本研究ではこれまで不明であったプロモーター領域の同定と、転写制御機構の解明を目的とした。HBZ 遺伝子にはスプライス (sHBZ) と非スプライス (usHBZ) の 2 つの転写が存在し、どちらのプロモーターも TATA-less であった。ルシフェラーゼを用いたプロモーター解析やクロマチン免疫沈降解析の結果から、スプライス sHBZ のプロモーター活性には Sp-1 が重要であることが明らかとなった。Tax による 5' LTR 転写活性化を抑制する機能は sHBZ が usHBZ より顕著であった。一方、T 細胞株増殖促進作用は sHBZ では認めたが、usHBZ では認めなかった。

#### (4) レトロウイルス感染における DNA 二重鎖切断修復酵素の役割解析

レトロウイルスは、逆転写反応により二重鎖 DNA を合成し、それを宿主ゲノムへと組み込む (integration)。これらの過程に宿主の DNA 二重鎖切断修復酵素が関与することが過去に報告された。しかし、その詳細な分子メカニズムは未解明である。我々は、レトロウイルスの組み込み部位を効率的に単離する手法を新たに考案し、HIV-1 の組み込み部位周辺の塩基配列を解析した。その結果、ATM、Mre11、NBS1、及び Artemis を欠損した細胞に組み込まれたウイルス DNA と宿主ゲノムとの結合部位において、2 種類の異常が認められた。一方は組み込み前に integrase によって除去されるはずの 2 塩基の残存であり、もう一方は全く由来のわからない塩基の挿入であった。これらの異常は、DNA 二重鎖切断修復酵素が integration の制御とウイルス DNA 末端の保護に関与していることを示している。Mre11 欠損細胞では primer binding site が残存していたことから、Mre11 の逆転写反応への関与も示唆された。これらの異常はマウス白血病ウイルス (MLV) においても認められた。さらに、HIV-1 の組み込み部位周辺に存在する塩基の指向性が ATM 欠損細胞において変化していたことから、ATM は HIV-1 の組み込み部位選択にも関与していることがわかる。以上の結果から、DNA 二重鎖切断修復酵素はレトロウイルスの感染過程において複数の役割を担っていることが明らかとなった。

#### (5) 次世代融合阻害剤の HIV-1 に対する耐性獲得機序の解明

HIV が宿主細胞に感染する最初のステップである、ウイルス・細胞間での膜融合を標的とした薬剤は、優れた治療効果を示す。我々はこれまで新規なペプチド性融合阻害剤として、SC34 および SC34EK を開発してきた。また、いくつかのグループからも、同様に強力な抗 HIV-1 効果を示す融合阻害剤が報告されている。これらの融合阻害剤は、現在臨床で使用されている enfuvirtide (T-20) に対する耐性ウイルスにも効果を示すことから、次世代の融合阻害剤としての臨床応用が期待される。我々はこれらの高活性融合阻害剤の耐性プロファイルを比較する目的で、SC34 および SC34EK に対する耐性ウイルスを誘導し、薬剤感受性の変化を調べた。その結果、SC34 および SC34EK により誘導された耐性変異は、両薬剤間で一部が共通するものの、大部分では異なっており、交差耐性は最小限にとどまっていた。また、多くの変異が蓄積された耐性ウイルスは高度耐性を示したが、いずれの変異も単一では薬剤感受性の変化は引き起こさなかった。この結果は、SC34 および SC34EK に対する高度耐性は比較的得られにくいことを示唆している。

#### (6) 低分子抗 HIV 薬剤の開発

薬物吸収性および薬剤開発の観点から、疾患に対する薬剤は低分子であることが望ましい。我々はこれまで本学薬学研究科と共同で、低分子抗 HIV 薬剤の開発を目的として様々な化合物の抗 HIV 活性を測定してきた。本年度も引き続き薬剤のスクリーニングを行い、また、新たにしたいいくつかの薬剤を同定した。得られた薬剤はいずれも低分子であり、数百 nM オーダーの活性を示した。今後はさらなる活性の増強と、作用機序の同定を行う予定である。

2009 年、当研究室では新たなメンバーとして、4 月より 2 名の大学院生（大学院生命科学研究科修士課程 1 年）井上真悠子さん、山口祐太郎君を迎えた。さらに、岡本啓治君が 3 月末で米国スクリプス研究所に留学し、後任として 7 月 1 日より米国 U.MASS の坪田智明さんを特定助教として迎えた。その結果、研究室はスタッフ 3 名、大学院生 9 名、技術補佐員 2 名、事務補佐員 1 名の 15 名の構成となった（2009 年 12 月末時点）。

引き続き、当研究室では哺乳類における染色体機能の調節、遺伝情報の普遍性および多様性をコントロールしている分子機構を明らかにすることを目指して研究を行っている。特に「細胞記憶」「エピジェネティック制御と生命現象」「核構造の機能」などをキーワードに研究を展開しており、新たな発見に遭遇すべく日々研究に励んでいる。

### 1) G9a ヒストンメチル化酵素による胚体系列での胚体外特異的遺伝子の抑制機構

ヒストン H3 のリジン 9(H3K9)のメチル化は、遺伝子発現の抑制やヘテロクロマチン化に重要なエピジェネティックマークの 1 つである。ヒストンメチル化酵素、G9a ノックアウト (KO) マウスでは H3K9 の大幅な低メチル化が起き、妊娠中期で胎生致死となることから、G9a もしくは G9a による H3K9 のメチル化はマウスの発生に必須である。しかし G9a-KO マウスが何故胎生致死になるのかまだ分かっていない。我々は G9a-KO ES 細胞を用いた実験から、G9a は組織特異的な遺伝子を抑制する機能を有していることを明らかにしており、そのことからマウスの発生に必要な遺伝子の発現調節に関わっていると予想した。胎児発生期における遺伝子発現調節に G9a がどのように関わっているのかを明らかにする目的で、我々は野生型或いは G9a-KO 胚（胎生期 9.5 日目）から胚本体と栄養外胚葉を単離し、RNA を精製した。これを用いてマイクロアレイ解析を行い、G9a によって制御されている遺伝子を網羅的に解析した。その結果、あるホメオボックス遺伝子 (Reproductive homeobox: *Rhox*) 遺伝子が G9a 欠損によって異所的に発現が亢進していることを見出した。*Rhox* 遺伝子群は X 染色体にマップされる、最近同定された新規の *Hox* 遺伝子である (Cell, 120 p369, 2005)。この *Rhox* 遺伝子は精巣や卵巣などの生殖器官と胎盤特異的に発現する。さらに、時間的にも量的にも共線性の発現パターンを示すが、その発現の制御のメカニズムは不明である。興味深いことに、DNA メチル化酵素の欠損により、胚本体特異的に *Rhox* 遺伝子クラスターの特異的サブセットが異所的に発現亢進することが見出されている (Genes Dev., 20, p3382, 2006)。これらの知見から、*Rhox* のユニークな発現パターンの確立や維持には H3K9 のメチル化と DNA のメチル化とが協調して働いていることが予想される。これを確かめるべく、現在胎生期 9.5 日目の胚を用いたクロマチン免疫沈降の予備実験を開始している。(立花、眞貝)

### 2) 着床前胚の発生における G9a ヒストンメチル化酵素の機能解析

卵細胞は母親由来のゲノムを次世代に伝えることの他に、排卵後のイベント、例えば Zygotic gene activation (ZGA) などに必須な母親由来の因子を排卵後の胚に伝えるという機能も併せ持つ。マ

ウスでは主に 2 細胞期で ZGA が起きる。我々は母親から引き継いだヒストン修飾酵素などのエピジェネティクス関連因子がマウス初期発生に必須の機能を持つのではないかと考えた。母親由来の G9a を除いた際影響を見る目的で G9a コンディショナルノックアウトマウスと Zona pellucida 3 (Zp3)-Cre トランスジェニックマウスとを交配した。得られた Zp3-Cre、G9aF/F マウスを野生型の雄と交配して繁殖性を調べた。野生型雌のおよそ 80%が繁殖性を示したのに対し、Zp3-Cre、G9aF/F マウスでのそれは約 35%に低下していた。さらに野生型雌マウスは一回のお産で平均 7 匹の仔を生むのに対し、Zp3-Cre、G9aF/F マウスは一回のお産で平均 2.1 匹しか生まなかった。次に排卵の過程が正常であるかどうかを調べる目的でマウスに過排卵処理を施して卵の数を調べたところ、野生型と Zp3-Cre、G9aF/F マウスに顕著な差は見られなかった（それぞれ平均 20 個と 21 個）。よって少なくともこの過程には G9a は必須ではないと考えられる。引き続きこれらの卵を野生型精子と受精させて試験管内培養を行った。4 日間の培養後では野生型卵由来の胚の 95%が胚盤胞に達したのに対し、変異型胚では 18%程度であった。このことから我々は母親由来の G9a が着床前の胚発生に必須の機能を有すると結論した。この表現型を説明する 1 つの可能性として母親由来 G9a が ZGA に必須であることが考えられた。今後 G9a による H3K9 メチル化と転写の抑制機構がマウス初期発生にどのように関わってくるのかを追求したい。(立花、眞貝)

### 3) ニューロン特異的 PR ドメインタンパク質 Prdm8 の発生期中枢神経系における発現解析

PR ドメインタンパク質は、ヒストンリジンメチル化酵素 SET ドメインタンパク質との相同性から注目を集めているタンパク質である。マウスでは Prdm1 から Prdm16 までの PR ドメインタンパク質が存在するが、その多くでヒストンメチル化活性は検出されていない。しかしながら近年では、PR ドメインタンパク質が発生や細胞分化の中枢を担う制御因子であることが数多く報告されており、その注目度はさらに高まっている。

我々の研究室では PR ドメインタンパク質の 1 つ Prdm8 が脳で特異的に発現していることを見出した。発生期中枢神経系組織に着目して Prdm8 タンパク質の詳細な発現解析を行ったところ、Prdm8 はニューロンサブタイプ特異的に発現していることが明らかとなった。網膜では Prdm8 は桿体双極細胞と一部のアマクリン細胞で、脊髄では V1 もしくは V2 介在ニューロンで、脳では主に大脳新皮質第 4 層ニューロンで発現していた。一部の例外は見られたが、Prdm8 の発現は細胞周期を脱した postmitotic ニューロンで見られており、Prdm8 タンパク質はニューロンの分化や成熟過程に寄与しているのではないかと考えた (Komai et al. 2009)。Prdm8 ノックアウトマウスの作製や胎生期マウス脳における Prdm8 のノックダウン実験により、その可能性の検証を現在進めている。(駒井、眞貝)

### 4) ヒストンリジンメチル化酵素 ESET は胚性幹細胞の内在性レトロウイルスの転写を抑制する

Long terminal repeat (LTR)を持つレトロウイルス様の因子である内在性レトロウイルス(ERV)は、哺乳類細胞のユウクロマチン部分に広く分布しており、マウスゲノムでは約 10%がそれを占める。さらにマウスでは、10%以上の自然発生的な遺伝変異はこれらの寄生的な ERV エlementによ

ると言われている。通常、プロウイルスの抑制は DNA のメチル化が重要な役割を持っているが、DNA のメチル化以外のメカニズムも胚性奇形腫や胚性幹細胞では機能していることが知られている。最近のゲノムワイドな解析からは、胚性細胞では、ERV が存在するゲノムの領域ではヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化(H3K9me3)と H4K20me3 が亢進していること、しかもこの亢進は繊維芽細胞では見られないことが明らかとなっている。しかし、これらのヒストンリジンメチル化修飾がプロウイルスの抑制にどのような役割を持っているのかは、明らかになっていなかった。今回の解析により、H3K9 メチル化酵素 ESET/SETDB1/KMT1E と Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein 1 (KAP-1)/Trim28 が ERV 領域に見られる H3K9me3 に必要で、ES 細胞における ERV と外来性のレトロウイルスの転写抑制に寄与することが明らかとなった。さらに、ESET のリジンメチル化活性が ERV の転写抑制と HP1 のリクルートメントに重要であること、一方 H4K20 メチル化酵素 Suv420h1/2 ならびに H4K20me3 は必須な役割を持たないことが判明した。興味あることに、*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* の 3 重ノックアウト ES 細胞では、ESET と KAP-1 の ERV 局在や ESET を介した H3K9me3 に変化がないこと、ERV の脱抑制は *Eset* 欠損 ES 細胞に比べて最小限度であることが分かった。これらの結果より、われわれは、KAP-1 と ESET/ESET を介した H3K9me3 による DNA メチル化非依存的な ERV 転写抑制系が胚性細胞特異的に存在し、この系は DNA のメチル化がダイナミックにリプログラムされる胚発生の早期で ERV の制御に重要な役割を持っていると考察した。(松井、眞貝)

2009 年 3 月に深澤嘉泊が本学人間・環境学研究科博士課程（人間・環境学）を、堀池麻里子が本学人間・環境学研究科修士課程（人間・環境学）を修了した。深澤は、米国オレゴン健康科学大学に留学、堀池は本学人間・環境学研究科博士課程（人間・環境学）に進学した。4 月には、大附寛幸が本学医学研究科医科学専攻修士課程に、仲宗根咲子、日向亮輔、藤田泰久が本学人間・環境学研究科修士課程（人間・環境学）に入学した。

当研究室の主要研究課題はヒトのレトロウイルス（HIV と HTLV）の感染を分子・培養細胞・感染個体レベルで総合的に解析することにより、これらウイルスの病原性を解明し、ウイルス疾患の治療と予防法を開発することを目的としている。また、レトロウイルス感染症に加えて、フラビウイルス感染症（デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス）の研究も行っている。2009 年の研究の進展は、以下のとおりである。

- 1) レンチウイルス急性感染期のアカゲザルで細胞ゲノム中にインテグレートされたウイルス DNA を持つ休止期 CD4 陽性 T 細胞が高率に見つかる。

SIV または CXCR4 を共受容体として用いる SHIV(X4-SHIV)急性感染期にはウイルス産生細胞の圧倒的大多数は休止期 CD4 陽性 T 細胞である事を以前に報告している。これらの知見をさらに発展させ、SIV または X4-SHIV 感染後 10 日間に採取した CD4 陽性 T 細胞が *ex vivo* でウイルスを放出する事を示した。さらに、この期間に末梢血中の休止期 CD4 陽性 T 細胞で宿主ゲノムにウイルス DNA が高率にインテグレートされている事を見いだした。SIV DNA はメモリー CD4 陽性 T 細胞にのみ、SHIV DNA は休止期ナイーブ CD4 陽性 T 細胞にインテグレートされていた。以上の結果より、急性感染期においては共受容体指向性に関わらず非ヒト霊長類レンチウイルス DNA を多くの休止期 CD4 陽性 T 細胞が持っており、子孫ウイルス産生の源泉となっている事が示された。感染制御のためには、急速で全身的なウイルス播種を阻止し、致死的な臨床的帰結を食い止めるための迅速でかつ持続的なウイルス複製の阻害が必要とされる。

- 2) SIV 感染 48 時間後から化学療法を開始すると、急性期のウイルス血症の抑制およびメモリー CD4 陽性 T 細胞の著減を阻止できるものの、発症を阻止する事は出来ない。

SIV 感染 48 時間後から 28 日間の強力な抗ウイルス剤化学療法を行った場合、宿主の免疫系が十分に感作され投薬中止後にウイルス複製が制御される可能性を検証した。6 頭の Mamu-A\*01 MHC ハプロタイプ陰性アカゲザルに SIV を接種し、48 時間後から tenofovir を投与すると、全頭でウイルス複製は強力に抑制されたが、投薬を中止するとやはり全ての個体で血漿中ウイルス RNA 量が上昇した。予想に反し、これら感染サルセットポイント体内ウイルス量は 2 分された。3 頭のウイルスコントローラーは  $1 \times 10^3$  copies/ml 台の血漿中ウイルス量であったのに対し、3 頭の子コントローラーは  $2 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$  copies/ml の血漿ウイルス RNA を示した。非コントローラーサルは感



染 60 週後までに全て免疫不全の症状を呈し斃死したが、コントローラーサルは感染 80 週後まで生き残った。興味深い事に 3 頭のコントローラーサルは、SIV 感染に対する抵抗性を付与する MHC class I アレルを持っており、このうち 2 頭では実験観察中に CTL 逃避変異体ウイルスが出現した。

### 3) 新規 HIV-1 治療法としての Vpr-Importin $\alpha$ 相互作用を介したヒト免疫不全ウイルス 1 型の核移行阻害

多剤耐性ウイルスの発生により、抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 療法の効力が損なわれ、他の治療選択の幅が制限されるため、新しい抗ウイルス薬を開発するための新しい標的を見出す必要がある。そのような標的の 1 つは、HIV-1 のアクセサリ遺伝子産物のうちの一つ、Vpr-Importin $\alpha$  間の相互作用である。この相互作用は、Vpr の核移行やマクロファージにおける HIV-1 複製に重要である。我々は新規阻害薬候補化合物としてヘマトキシリンを同定した。ヘマトキシリンは、Vpr-Importin $\alpha$  間の相互作用を抑制することによって、Vpr 依存的に HIV-1 の複製を阻害する。リアルタイム PCR による解析から、ヘマトキシリンが特にインテグレーション前駆体の核移行ステップを阻害することが示された。このように、ヘマトキシリンは Vpr-Importin $\alpha$  間の相互作用を介する HIV-1 の核移行を標的とする新しい抗 HIV-1 阻害薬であり、特定のウイルスタンパク質-宿主細胞因子間相互作用の阻害薬が HIV-1 治療に新たな戦略を提供する可能性を示唆している。

### 4) HIV 感染症における免疫阻害閾値

長期間にわたる HIV-1 感染者の研究より、感染から AIDS 発症までの無症候期間の長さは非常にまばらで、それでいて非常に長いことが明らかになった。ある感染者では、15 年以上という長い無症候期間を持つ一方、違った感染者では、2 年以内に AIDS を発症することもある。疾患進行の基本原理は、未だに解明されていないが、多くの研究者たちが、その原理を説明しようと試みている。例えば、1990 年代の初期に、Martin A. Nowak は、ウイルス学的な多様性が疾患の進行と AIDS 発症に関して重要な役割を果たしている可能性があることを報告した。これらの研究は、無症候期間が変動することへの一つのみごとな説明を与えた。本論文では、単純な数理モデルを用いて、それらの変動性に違った説明を与える。主なアイデアは、HIV 感染症の過程で、免疫機能が阻害される割合が増加していくという事実である。そして、我々のモデルは、これらの阻害率には、“危険閾値”と“免疫不全閾値”と呼ばれる値が存在することを示している。ここで、危険閾値とは、阻害率がその値を超えたときに、免疫機能が崩壊する「かもしれない」ということを意味している。また、免疫不全閾値は、阻害率がその値を超えたときに、免疫機能が「必ず」崩壊するということの意味している。私たちは、無症候期間の長さは、感染者のウイルス学的・免疫学的な状態に依存して、これら 2 つの閾値の間で、確率的に決定されるということを発見した。さらに、我々は、HIV 感染者が経験するであろう、無症候期間の分布や免疫反応の生存率を調べた。

### 5) レオウイルス muNS および mu2 の機能ドメインの同定

哺乳類レオウイルスは 10 分節の 2 本鎖 RNA ゲノムを持つ非エンベロープウイルスである。レオウイルスの複製は非構造蛋白質および構造蛋白質により形成される細胞質内の viral inclusion で

行われる。しかし、viral inclusion の機能的、構造的解析は進んでいない。本研究では、ウイルス複製における viral inclusion の機能を理解するため、RNA interference (RNAi) およびリバーシジェネティクス法を用いて viral inclusion 形成に関わる muNS および mu2 の機能ドメインの同定を行った。mu2 および sigmaNS の結合領域を含むアミノ末端領域を欠損させた muNS 変異体では、viral inclusion の形成に影響は認められなかったが、ウイルス複製は顕著に阻害された。この結果は、mu2-muNS、sigmaNS-muNS の結合は viral inclusion の機能に必須であることを示している。対照的に、オリゴマー形成に関わる領域を含むカルボキシル末端を欠損させた muNS 変異体では、viral inclusion 形成およびウイルス複製が抑制された。mu2 の変異体を用いた解析から、NTPase 活性化ドメインおよびアミノ末端領域に存在する核移行シグナルとして機能する塩基性に富むアミノ酸領域はウイルス複製に必須であることが明らかとなった。Viral inclusion 形態 (globular または filamentous 形態) に影響を与える mu2 変異体を用いた解析から、viral inclusion 形態の違いは、ウイルス複製に影響しないことが示された。RNAi およびリバーシジェネティクス法を用いた muNS および mu2 の機能ドメインの詳細な解析結果は、ウイルス複製、viral inclusion 機能を理解する上で極めて重要な知見を与えると考えられる。

新興ウイルス感染症研究センターがウイルス研究所に設置されてから丁度4年が経過しました。当チームの構成員は、リーダー（井戸）の下に研究補佐の3名(多田哲子、岩元静香、梅原綾)から成る極めて家族的な雰囲気の研究室です。今年度は、この他にコンゴ民主共和国から大阪大学の国費留学研究生として来日したDr. Magot Omokoko氏を共同研究者として迎え、紅一点ならぬ黒一点の若人が集うユニークな研究室となりました。

本研究室では、主に2つの研究テーマを重点として活動しています。先ず第1は、「中央部アフリカにおけるHIV/SIVの遺伝子解析」です。今日世界に蔓延するエイズウイルス(HIV-1)が最初に人間社会に登場したのは、アフリカ大陸の中央部と考えられています。それは世界中のHIV-1の遺伝子を調べてみると、実に多様性が大きいことがすぐに分かるのですが、とりわけ中央部アフリカのそれが最もヴァリエティに富んでいるという事実から導き出されたことなのです。HIV-1は非常に変異速度が大きいですから、多様性があるということはそれだけ発生してから時間が経った、即ちそのような場所が起源地ということになります。しかしながら、では具体的にどの国のどの地点かとなると、これがまだはっきりとした解答が得られていません。その謎を解き明かすため、コンゴ共和国、コンゴ民主共和国、カメルーン共和国といった広大な熱帯雨林地帯の中へ海外調査を行っています。ヒトや時にはサル・類人猿から検体を集め、その中からHIV/SIV(あるいは関連レトロウイルスとしてHTLV/STLVも)を分離し、それらの分子系統解析を行なうことにより、その疑問の解明に迫りたいと各地を廻っているわけです。2009年は、コンゴとコンゴ民主の2ヶ国を訪問しました。コンゴでは、ほぼ赤道直下のガボン国境に近い辺境の地まで足を延ばして検体を集めました。その地域は首都から遠く離れ、劣悪な道路事情から周辺地域との人や物資の移動が極めて限られています。従って他地域からの食料供給も困難ですから、地域住民にとっては罨で捕らえた様々な野生動物の肉が貴重な蛋白源となっています。動物種の中には類人猿やサル種も含まれており、こうした特異な食習慣の故にしばしばエボラ出血熱が発生しています。こうしたブッシュミートを介して何らかの類人猿・サル種の持っていたHIVの祖先ウイルスが人間社会に入り込んだのではないかと考えられており、その証拠を分子疫学的に見つけ出そうというわけです。コンゴでは、他に大西洋岸のポイントノール市内の診療所をコホートとして、毎年検体を集めています。多様な株の流行状況を明らかにするだけでなく、薬剤耐性変異はどの程度出現しているのか、あるいは患者個体内でウイルスがどのように進化しつつあるのかといった他の場所では得られない貴重なデータが得られるものと期待しています。コンゴ民主では、近年国内の各地を隈なく調査するプロジェクトを進めていますが、今年度はコンゴ盆地の最深部となる赤道州から初めて検体を集めました。現地協力機関との友好的な関係が長年に渡って築き上げられているので、今ではどの国の研究グループも調査に入ったことのない奥地にまで出かけることができます。これまで報告されたことのない新型ウイルスの発見などが期待されています。

第2の重点研究は、「新規 HIV/SIV キメラウイルス(SHIV)を用いたエイズ治療・予防薬の開発で

す。京都大学ウイルス研究所内には、BSL3 の動物感染実験が可能な飼育施設が設置されていますので、この貴重な施設をエイズ基礎研究のために最大限活用すべく、特に抗 HIV-1 薬剤を動物個体レベル（具体的にはサル）で評価できる系の確立を目指しています。通常サルに感染することが知られている SHIV は、env 遺伝子だけが HIV-1 由来であり pol 遺伝子部分(ここには薬剤の多くが標的とする PR、RT、INT の各遺伝子がコードされている)は SIV 由来のため、抗 HIV 薬の評価には適しません。そこで我々は、SIV のゲノムに HIV-1 の pol 遺伝子の一部または全部を置換導入した一連の新規 SHIV を作成することにしました。本年度は、こうして作成した SHIV の一つ(SHIV-pr)が持続感染しているサルに対して、実際にヒトの治療に用いられている PR 阻害剤や RT 阻害剤に加え、新しいタイプの INT 阻害剤（アイセントレス錠）を経口投与した実験を行いました。その結果、4 週間の投薬期間の後に血中ウイルス量が検出限界以下に下がること、投薬を停止したら僅か 1-2 週以内にそれが元の値にまでリバウンドすることを明らかにすることが出来ました(図 1)。このことは、作成した新しい SHIV に感染したサルを用いて動物レベルの HAART モデル系が事実上確立されたことを意味しています。今後こうして開発したモデル系を利用して、ヒトに応用するには早期過ぎる実験的治療法や予防法などを試みる研究を展開したいと考えています。

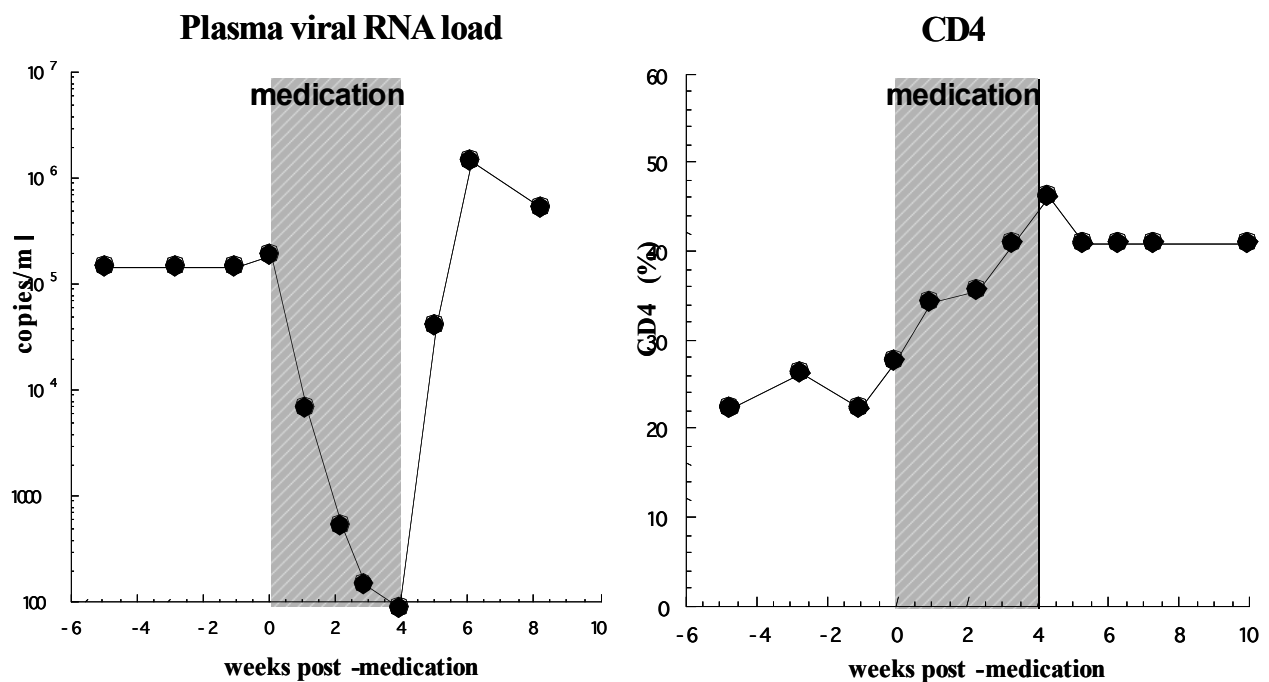


図 1. SHIV-pr が持続感染したアカゲザルに PR、RT、INT 阻害剤を 4 週間経口投与した前後の血中ウイルス量と CD4 細胞数の変動(リンパ球全体の中の割合)を示す。

本研究チームの最終年度にあたる 2009 年度は鈴木陽一（特別教育研究准教授）がスタッフとして、そして鈴木康嗣（生命科学研究科博士課程）が大学院生として所属した。そして、ウイルス病態研究領域より篠田康彦（医学研究科博士課程）、渡部匡史（医学研究科博士課程）、ならびに山元誠司（生命科学研究科博士課程）が本研究チームの研究活動に参加してくれた。

我々は、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) やマウス白血病ウイルス (murine leukemia virus: MLV) といったレトロウイルスを研究対象とし、宿主細胞とウイルスとの関わり合いについて研究をおこなっている。レトロウイルスは標的細胞に侵入すると、逆転写酵素反応によってゲノム RNA からウイルス DNA を合成する。そして、このウイルス DNA がクロマチンに組み込まれる (インテグレーション: integration) ことによって感染が成立する。インテグレーション反応を直接触媒する酵素はウイルス由来のインテグラーゼ (IN) であるが、感染細胞内では様々な因子がこのウイルス DNA 組み込み反応を制御すると考えられている。本研究チームの主要なテーマは、レトロウイルスインテグレーションに影響を与える細胞性因子を明らかにし、その分子作用機序を解明することである。

本研究チームの発足時より 4 年間多大なるご支援を頂いた小柳義夫教授ならびにウイルス病態研究領域の方々にはこの場を借りてお礼を申し上げたい。

#### 1) 細胞性キナーゼによるレトロウイルスインテグレーション複合体の機能不全化（鈴木康嗣、篠田康彦、鈴木陽一）

レトロウイルスの感染細胞におけるインテグレーションは、ウイルス DNA や IN だけでなく、様々な蛋白質から構成される preintegration complex (PIC) と呼ばれる高分子複合体を介して実行される。DNA 結合性因子である barrier-to-autointegration factor (BAF) は、ウイルス DNA に会合することで HIV-1 や MLV PIC の構成蛋白質として存在するが、この細胞性蛋白質は PIC のインテグレーション活性を *in vitro* において促進する。一方、BAF の機能は細胞周期によっても調節されており、特にその DNA 結合活性は細胞性キナーゼである vaccinia-related kinase (VRK) によるリン酸化修飾によって減少することが明らかにされている。最近、ワクシニアウイルス感染における BAF の興味深い役割が明らかとなった。細胞質に存在する BAF はワクシニアウイルス DNA にも結合し、結果的にウイルス DNA の複製を抑制する。しかし、ワクシニアウイルスは VRK の細胞性ホモログである B1 キナーゼを発現し、BAF をリン酸化することによって、BAF による複製阻害から逃れることが報告された。BAF の DNA 結合活性はレトロウイルス PIC のインテグレーション活性促進にも必須であることから、リン酸化によって BAF を PIC から解離すれば、結果的に PIC のインテグレーション機能を阻害することができるとも考えられる。本研究では、マウスの VRK ファミリー蛋白質 (VRK1 ならびに VRK2) が BAF のリン酸化を介して、実際に MLV PIC からの BAF の解離と PIC インテグレーション活性の低下を誘導できることを見出した。また、VRK によってリン酸化修飾を受けた BAF は PIC 活性の促進機能を喪失していた。さらに、ヒトの VRK1 も HIV-1 PIC のイン

テグレーション活性を *in vitro* において抑制できることが示された。これらの結果は、VRK のような細胞性キナーゼによって実行されるレトロウイルスインテグレーション抑制メカニズムの存在を示唆するものである。

## 2) HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ Huwe1 の HIV-1 感染における役割 (山元誠司、鈴木陽一)

インテグレーション反応はレトロウイルス感染に必須の過程であり、インテグラーゼ (IN) がその触媒酵素である。最近、我々は MLV ならびに HIV-1 IN の細胞性結合因子として Huwe1 を同定した。Huwe1 は HECT ドメインをもつ E3 ユビキチンリガーゼであり、Mcl-1 や p53 といった蛋白質のユビキチン化、そしてそれに伴う標的蛋白質の分解を誘導することが報告されている。本研究では、Huwe1 はレトロウイルス PIC に会合することが示されたが、Huwe1 ノックダウン細胞に対する MLV もしくは HIV-1 ベクターの感染性は、コントロール細胞に対するそれと変化がみられなかった。このことは、レトロウイルス感染において、Huwe1 がインテグレーションまでの段階には関与しないことを示している。しかし HIV-1 感染細胞から放出されるウイルスの性状を解析したところ、Huwe1 をノックダウンした MT-4 細胞株から産生されるウイルスの感染価は、コントロール細胞由来のウイルスに比べて増加していることが明らかとなった。さらに、Huwe1 は IN 領域依存的に HIV-1 の Gag-Pol 前駆体蛋白質とも結合した。これらの結果は Huwe1 がウイルス複製の後期過程において、感染性ウイルス粒子の形成を制御する可能性を示している。

## 3) Rho GTPase Rac2 による HIV-1 感染の抑制 (渡部匡史、鈴木陽一)

Rho GTPase ファミリーは細胞内の分子スイッチとして機能し、細胞内膜輸送やアクチン再構成を制御するだけでなく、T 細胞の分化や細胞内シグナル伝達にも関与することが知られている。しかし、Rho GTPase ファミリー分子の HIV-1 感染における役割はまだ明らかになっていない。そこで、Rho GTPase ファミリーなかでも特に血球系細胞に発現している Rac 2 に着目し、HIV-1 の複製における影響を解析した。Rac2 の発現が認められない CD4 陽性 T 細胞株 (MT-4 細胞) を用いて、FLAG タグ融合 Rac2 を恒常的に発現する T 細胞を作製し、HIV-1 に対する感受性を検討したところ、Rac2 恒常発現 T 細胞ではウイルス感染による細胞変性効果が減少し、ウイルスの増殖も有意に低下した。また、HIV-1 プロウイルス由来の DNA と Rac2 発現プラスミド DNA を 293T 細胞に共導入した実験からは、Rac2 はウイルス DNA からの遺伝子発現を抑制し、その結果、産生されるウイルス量を著しく減少させることが明らかとなった。さらに、この抑制効果は恒常活性型 Rac2 の過剰発現によって増強された。以上の結果は、Rac2 が細胞内で HIV-1 複製の阻害因子として機能することを示唆するものである。

マウス作製支援チームはウイルス研究所動物委員会の下でマウス受精卵の凍結保存をはじめトランスジェニックマウス（Tg）やノックアウトマウス（KO）の作製支援を行っている。また、生殖工学技術を用い、体外受精によるマウスコロニーの拡大、ホモマウス作製、胎生期解析用の受精卵準備や ICSI（顕微授精）、卵巣移植なども実施可能である。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tgkoivf/index.htm>

メンバーはゲノム改変マウス研究領域所属の宮地（技術専門職員）と生体防御研究分野所属の北野（技術職員）の2名。過去3年間の実績は下記の通りである。

#### 1) 胚の凍結保存

2007 年	74 系統	22,069 個
2008 年	62 系統	20,525 個
2009 年	75 系統	20,337 個

#### 2) 外部機関からのマウス導入

	凍結胚	生体
2007 年	3 系統	4 系統
2008 年	4 系統	2 系統
2009 年	7 系統	2 系統

#### 3) トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数	Tg 産仔数
2007 年	11	2,937	32 (1.1%)
2008 年	52	20,379	125 (0.6%)
2009 年	97	33,821	190 (0.6%)

#### 4) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2007 年	37	5,237	367 (7.0%)
2008 年	49	7,252	357 (4.9%)
2009 年	52	4,587	242 (5.3%)

ウイルス研究所ネットワークシステムは、淀井教授、秋山教授、豊島教授、竹本助教、相楽技官より構成されるネットワーク委員会によって管理され、ウイルス研究所、附属ゲノム医学センターおよび医学部分子医学専攻の3部局が含まれる分子生物学実験研究棟、および動物実験棟へサービスを提供している。

本研究所 LAN は、SUN ワークステーション、Linux サーバおよびウインドウズサーバなどを用いて、情報伝達の高速性・機能性・安全性を満たすサービスの提供を第一に、電子メール・WWW・ファイル・ライセンスサーバ等を運用している。

今年度はメールサーバ及び POP サーバのリプレースを行い、メール配信プログラムを Sendmail から Postfix へ移行した。プログラムのチェック、作業スケジュールの広報など、メールの送受信に不便がないよう注意したが、OS の変更を伴ったためユーザーに若干負担をかけてしまった。アカウントファイル等を新マシンにそのまま移す事ができなかった問題は今後のリプレースで考えてなくてはならない点である。また、来年度には耐震改修工事が始まるため、一時的な引越しなどを含めウイルス研ネットワークをどのように維持し運営してゆくか、ネットワーク委員会とメディアセンター、施設部で協議を重ねている。出来る限り KUINS ネットワークと協調し、かつ所内独自の柔軟なサービスを継続して提供できるように計画している。

一方、昨年の京都大学情報セキュリティポリシー改定に続き、今年は「京都大学全学情報システム利用規則」が2010年1月に制定された。KUINS に接続された部局情報システムおよび利用者はセキュリティ対策基準に則り利用方法や情報管理を見直す必要がある。当研究所ではWEBシステムを利用した所内広報やSQLサーバによるMACアドレス管理を行っており、ハードウェアの管理やOS・ソフトウェアの脆弱性の点検等は日ごろから心がけているが、セキュリティ教育の徹底や情報資産の格付けなどは今後取り組まなくてはならない課題が残っている。ウイルス研究所に配送される電子メールの9割近くがSpamメールであり、コンピュータウイルスが添付されている以外に様々なスクリプトが仕掛けられている。さらに正規のホームページが改ざんされ閲覧したユーザーがマルウェア感染する事件も相次いで報道されている。研究活動にネットワークを介した情報アクセスが欠かせないものである以上、管理グループだけでなくユーザー全体の知識の底上げがますます重要になっている。



## ■構 成 員

所 長 影 山 龍一郎  
副 所 長 松 岡 雅 雄

### 協 議 員

ウイルス研究所教授	淀 井 淳 司
ウイルス研究所教授 (併)	米 原 伸
ウイルス研究所教授	影 山 龍一郎
ウイルス研究所教授	松 岡 雅 雄
ウイルス研究所教授	大 野 睦 人
ウイルス研究所教授	生 田 宏 一
ウイルス研究所教授	眞 貝 洋 一
ウイルス研究所教授	小 柳 義 夫
ウイルス研究所教授	杉 田 昌 彦
ウイルス研究所教授	藤 田 尚 志
ウイルス研究所教授	秋 山 芳 展
ウイルス研究所教授	五十嵐 樹 彦
ウイルス研究所教授	豊 島 文 子

### 研 究 部

#### がんウイルス研究 (大) 部門 がん遺伝子研究分野

教 授・京大理博	秋 山 芳 展
准 教 授・京大医博	酒 井 博 幸
准 教 授・阪大理博	森 博 幸
助 教・京大農博	柳 川 伸 一
助 教・京大理博	千 葉 志 信

#### 細胞制御研究分野

教 授・京大医博	杉 田 昌 彦
准 教 授・大阪市大医博	松 永 勇

#### 生体発がん機構研究分野

教 授 (併)・京大理博	米 原 伸
--------------	-------

#### ヒトがんウイルス研究分野

准 教 授・信大医博	土 方 誠
------------	-------

#### 遺伝子動態調節研究 (大) 部門 分子遺伝学研究分野

教 授・早稲田大理博	藤 田 尚 志
准 教 授・阪大理博	米 山 光 俊
助 教・北大薬博	高 橋 清 大

#### 情報高分子化学研究分野

教 授・京大理博	大 野 睦 人
助 教・京大理博	北 畠 真

助 教・京大理博	谷 口 一 郎
----------	---------

#### 遺伝子情報解析研究分野

准 教 授・阪大理博	大 森 治 夫
------------	---------

#### 生体応答学研究 (大) 部門

##### 生体防御研究分野

教 授・京大医博	生 田 宏 一
助 教・京大理博	上 田 正 道
助 教・阪大保健博	谷 一 靖 江
助 教・京大生命博	原 崇 裕
技術職員	小 中 さつき

##### 感染防御研究分野

教 授・京大医博	淀 井 淳 司
准 教 授・京大医博	増 谷 弘
助 教・京大理博	竹 本 経緯子
助 教・京大医博	孫 安 生
技術専門職員	相 楽 真太郎

##### 応答調節研究分野

教 授 (客)・阪大医博	高 濱 洋 介
准 教 授 (客)・北大理博	田 辺 秀 之

#### 細胞生物学研究 (大) 部門

##### 構造形成学研究分野

教 授・京大理博	豊 島 文 子
助 教・京大生命博	松 村 繁

##### 増殖制御学研究分野

教 授・京大医博	影 山 龍一郎
准 教 授・京大医博	大 塚 俊 之
助 教・京大理博	小 林 妙 子

##### 信号伝達学研究分野

准 教 授・東大獣医博	宮 沢 孝 幸
助 教・京大理博	村 上 昭

##### 情報制御学研究分野

教 授・(客)	利 根 川 進
---------	---------

#### 附属エイズ研究施設

##### ウイルス病態研究領域

施 設 長・教 授・京大医博	小 柳 義 夫
助 教・東北大医博	蝦 名 博 貴

##### ウイルス制御研究領域

教授・熊大医博	松 岡 雅 雄
助 教・京大医博	佐 藤 賢 文
技術職員 (臨床検査技師)	田 邊 順 子

## ウイルス発症機構研究領域

教 授 (客) 熊大医博 原 田 信 志

## 附属感染症モデル研究センター

### ゲノム改変マウス研究領域

教 授・順天堂大医博 眞 貝 洋 一  
准 教 授・東大農博 立 花 誠  
特定助教・奈良先端<sup>イ</sup>付博 坪 田 智 明  
技術専門職員 宮 地 均

## 霊長類モデル研究領域

センター長・教授・阪大医博 五十嵐 樹 彦  
准 教 授・東大農博 三 浦 智 行  
助 教・阪大医博 小 林 剛

## 附属新興ウイルス感染症研究センター

センター長・教 授・京大医博 小 柳 義 夫  
複製基盤解析チーム・特別教育研究准教授・東大理博

井 戸 栄 治

宿主要因解析チーム・特別教育研究准教授・東京医歯大医博

鈴 木 陽 一

## 非常勤講師

仁 木 宏 典  
西 頭 英 起  
俣 野 哲 朗  
西 平 順  
宮 澤 正 顕  
間 野 博 行  
今 村 健 志  
高 崎 智 彦  
鳥 居 隆 三  
甲 斐 知恵子

## 事 務 部

事 務 長 野 木 正 博  
掛 長 木 村 智 子  
主 任 大 槻 薫  
事務職員 檜 村 洋 志  
掛 長 山 崎 義 文  
主 任 谷 川 牧 子  
事務職員 井 上 有 紀  
事務職員 今 井 敦 宣

## 研 究 員

がんウイルス(がん遺伝子) 檜 作 洋 平  
生体応答学(生体防御) 有 元 啓一郎

生体応答学(生体防御)

生体応答学(感染防御)

生体応答学(感染防御)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(増殖制御学)

細胞生物学(信号伝達学)

細胞生物学(信号伝達学)

エイズ(ウイルス制御)

エイズ(ウイルス制御)

後 藤 覚

松 尾 禎 之

渡 辺 理 江

Aitor Gonzalez-Gonzalez

下 條 博 美

楯 谷 智 子

丹 羽 康 貴

今 吉 格

磯 村 彰 宏

松 田 孝 彦

星 野 重 樹

佐 藤 英 次

FAN JUN

志 村 和 也

## 大 学 院 生

### 理学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)

斎 藤 啓

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

霧 生 尚 志

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

宮 田 淳 美

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

鈴 木 達 也

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

Mc Closkey 亜紗子

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

竹 村 玲 子

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

藤 田 恵

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

藤 井 耕太郎

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

秋 石 和 宏

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

坂 田 知 子

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

竹 岩 俊 彦

遺伝子動態調節(情報高分子化学)

和 泉 光 人

### 医学研究科大学院生

生体応答学(生体防御)

梁 冰 霏

生体応答学(感染防御)

陳 喆

生体応答学(感染防御)

正 木 聡

細胞生物学(増殖制御学)

都 留 常 央

細胞生物学(増殖制御学)

松 永 充 博

細胞生物学(増殖制御学)

陳 素 麗

細胞生物学(増殖制御学)

渡 邊 直 希

細胞生物学(信号伝達学)

庄 嶋 貴 之

細胞生物学(信号伝達学) (休)

岡 田 雅 也

細胞生物学(信号伝達学)

仲 屋 友 喜

エイズ(ウイルス病態)

篠 田 康 彦

エイズ(ウイルス病態)

佐 藤 佳

エイズ(ウイルス病態)

小 林 朋 子

エイズ(ウイルス病態)

渡 部 匡 史

エイズ(ウイルス病態)

Peter Gee

エイズ(ウイルス制御)	萩屋啓太
エイズ(ウイルス制御)	磯部武久
エイズ(ウイルス制御)	趙鉄軍
エイズ(ウイルス制御)	内藤武志
エイズ(ウイルス制御)	中西梓
エイズ(ウイルス制御)	田口奈々絵
エイズ(ウイルス制御)	菅田謙治
エイズ(ウイルス制御)	馬広勇
エイズ(ウイルス制御)	Aaron Coutts
感染症モデル(霊長類モデル)	梁瀬賢志
感染症モデル(霊長類モデル)	大附寛幸

### 人間・環境学研究科大学院生

細胞生物学(信号伝達学)	大畑拓司
細胞生物学(信号伝達学)	吉川禄助
感染症モデル(霊長類モデル)	日向亮輔
感染症モデル(霊長類モデル)	松田健太
感染症モデル(霊長類モデル)	中村仁美
感染症モデル(霊長類モデル)	堀池麻里子
感染症モデル(霊長類モデル)	藤田泰久
感染症モデル(霊長類モデル)	中宗根咲子

### 生命科学研究科大学院生

がんウイルス(がん遺伝子)	梶谷直子
がんウイルス(がん遺伝子)	佐塚文乃
がんウイルス(がん遺伝子)	服部徳哉
がんウイルス(がん遺伝子)	田中夏子
がんウイルス(細胞制御)	森田大輔
がんウイルス(細胞制御)	浦川哲生
がんウイルス(細胞制御)	小林千沙
がんウイルス(細胞制御)	小森崇矢
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	□月
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	久島透嘉
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	阿部雄一
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	筒井智恵子
がんウイルス(ヒトがんウイルス)	清水麻希子
遺伝子動態調節(分子遺伝)	成田亮
遺伝子動態調節(分子遺伝)	呉成旭
遺伝子動態調節(分子遺伝)	影山麻衣子
遺伝子動態調節(分子遺伝)	Anna Wrabel
遺伝子動態調節(分子遺伝)	應田涼太
遺伝子動態調節(分子遺伝)	佐藤圭
遺伝子動態調節(分子遺伝)	常喜儒彦
遺伝子動態調節(分子遺伝)	高松詩穂理
遺伝子動態調節(分子遺伝)	西川千紘
遺伝子動態調節(分子遺伝)	劉知昇

遺伝子動態調節(分子遺伝)	高橋あゆみ
生体応答学(生体防御)	阿部昌史
生体応答学(感染防御)	吉原栄治
生体応答学(感染防御)	諏訪秀行
生体応答学(感染防御)	榮長裕晴
生体応答学(感染防御)	Dorys Adriana Lopez
細胞生物学(構造形成学)	濱崎真弓
細胞生物学(構造形成学)	井川敬介
細胞生物学(増殖制御学)	坂本雅行
細胞生物学(増殖制御学)	播磨有希子
エイズ(ウイルス病態)	安藤良徳
エイズ(ウイルス病態)	山元誠司
エイズ(ウイルス病態)	横山貴章
エイズ(ウイルス制御)	櫻井康晃
エイズ(ウイルス制御)	水戸部雄一
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	松井稔幸
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	駒井妙
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	村上万里絵
感染症モデル(ゲノム改変マウス)(休)	奥野周蔵
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	楊嘉銘
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	出口勝彰
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	村松大輔
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	山口祐太郎
感染症モデル(ゲノム改変マウス)	井上真悠子
新興ウイルス(宿主要因)	鈴木康嗣